

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FERMENTATION ANAÉROBIE

PRODUITE PAR LE

BACILLUS ORTHOBUTYLICUS

SES VARIATIONS SOUS CERTAINES INFLUENCES BIOLOGIQUES

PAR M. L. GRIMBERT

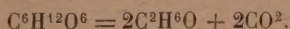
Pharmacien des hôpitaux.

(Travail du laboratoire de M. Duclaux, à l'Institut Pasteur.)

Quand un ferment organisé se développe dans un milieu nutritif, il emprunte à ce milieu les matériaux dont il a besoin pour vivre ; il en résulte la destruction du corps fermentescible, dont les molécules forment de nouveaux groupements, en même temps que la chaleur dégagée dans la réaction fournit l'énergie nécessaire à la fonction du ferment.

Est-il possible de traduire cette réaction par une équation chimique, c'est-à-dire de retrouver dans les corps produits par la vie du ferment la totalité des atomes dont se composait la matière première fermentescible ?

Pendant longtemps on a admis avec Dumas que la fermentation du sucre sous l'influence de la levure de bière se faisait d'après la formule très simple :



Mais quand on eut découvert, dans les liqueurs fermentées, l'acide succinique et la glycérine, et qu'on voulut introduire ces

nouvelles substances dans l'équation, celle-ci perdit de sa simplicité.

D'ailleurs, les idées reçues sur le mécanisme des fermentations se modifiaient profondément, grâce aux travaux de M. Pasteur.

Au lieu des théories de Berzélius et de Liebig qui faisaient du ferment un corps inerte, n'agissant que par sa présence ou par le mouvement de décomposition qu'il communiquait au liquide, M. Pasteur démontrait victorieusement qu'un ferment est avant tout un être vivant et que la fermentation n'est que la conséquence de la vie.

Néanmoins, tenant compte, dans la fermentation alcoolique, de la petite quantité de sucre utilisée par la levure pour ses besoins, M. Pasteur arrivait à établir une balance assez exacte entre le sucre détruit et les différents corps formés, et l'expérience a démontré que ce rapport ne varie que dans des limites relativement restreintes, au moins en ce qui regarde la production de l'alcool et de l'acide carbonique. Mais, en est-il de même pour les ferments différents de la levure, et moins limités dans le choix de leurs aliments, pour les ferments butyriques, lactiques, acétiques et autres ?

Déjà, dans l'étude de la fermentation butyrique, M. Pasteur ¹ constatait que l'expérience ne s'accordait jamais avec la formule donnée; que la proportion des gaz dégagés variait dans le courant de la fermentation.

Plus récemment, M. Perdrix ² démontrait qu'un même ferment peut donner des produits en quantités variables suivant son âge.

Si on envisage la fermentation comme le résultat d'un acte vital, le problème se complique de toutes les causes qui peuvent influencer la vie du ferment.

Est-il possible alors d'enfermer le processus de décomposition des substances fermentescibles dans les limites d'une équation simple, comme s'il s'agissait d'une désagrégation de molécules sous l'action d'un réactif ?

Le rapport entre le corps qui fermente et les produits formés, sera-t-il constant pendant toute la durée de la fermentation ?

1. L. PASTEUR, *Etudes sur la bière*, p. 297.

2. Ces Annales, t. V, p. 287.

L'âge du ferment aura-t-il une influence sur le phénomène? Ne faudra-t-il pas tenir compte de l'éducation de cette semence? Tel ferment, par exemple, capable de se développer sur divers milieux et de les faire fermenter, variera-t-il dans ses manifestations quand, habitué à vivre dans un milieu donné, on le transportera dans un autre, où bien fera-t-il fermenter ce dernier comme s'il y avait toujours vécu?

C'est pour répondre en partie à ces questions que j'ai entrepris l'étude des actions chimiques d'un bacille anaérobie que j'ai découvert et pour lequel je propose le nom de *Bacillus orthobutylicus*.

Depuis les travaux de M. Pasteur sur la fermentation butyrique, l'étude des ferments anaérobies n'a donné lieu qu'à un nombre restreint de mémoires. La difficulté du mode opératoire entre sans doute pour quelque chose dans cette abstention. La plupart des auteurs qui se sont occupés de ces fermentations semblent s'être attachés surtout à déterminer minutieusement la nature des produits formés, sans s'inquiéter des circonstances qui peuvent les faire varier.

Nous citerons notamment les travaux de Fitz¹ sur le *Bacillus butylicus* et sur le *Bacillus ethylicus*; ceux de Frankland² et de ses élèves sur le *Bacillus ethaceticus*, et ceux de Perdrix³ sur le *bacille amylozyme*. Il ressort, toutefois, des expériences de ce dernier, que l'âge d'un microbe, les conditions de milieu dans lesquelles il évolue, peuvent apporter des changements dans le développement et les produits de la fermentation. Mais le phénomène, en se compliquant, restait encore simple, puisqu'on pouvait y voir la superposition de deux modes seulement d'existence.

Je diviserai le présent travail en trois parties :

Dans la première partie, je décrirai l'origine, la morphologie et les diverses méthodes de culture du *Bacillus orthobutylicus*, ainsi que les procédés employés pour l'analyse des produits de la fermentation.

Dans la deuxième partie, j'étudierai plus spécialement l'influence de la réaction du milieu, de l'âge et de l'éducation de la

1. A. Fitz, *Deutsch. chem. Gesellsch.*, 1876-1877-1878-1880-1882.

2. *Journ. of chem. Soc.*, XX, 234; XXI, 432, 736.

3. Sur les fermentations produites par un microbe anaérobie de l'eau.

semence, et de la durée de la fermentation sur les produits de la réaction.

Dans la troisième partie, je passerai en revue l'action du bacille sur les différents milieux qu'il peut faire fermenter.

Ce travail a été exécuté dans le laboratoire et sous la direction de M. Duclaux. Qu'il me soit permis de lui exprimer ici ma profonde gratitude pour les bienveillants conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer.

I

ORIGINE. — Le *Bacillus orthobutylicus* est un microbe anaérobie du sol. Je l'ai isolé d'une fermentation de tartrate de chaux, mise en marche au moyen de quelques gouttes d'une macération de graines de légumineuses. — La présence de ce bacille dans cette fermentation était tout accidentelle, car, ainsi que je le démontrerai plus bas, il est sans action à l'état pur sur le tartrate de chaux.

J'employai, pour le séparer, le procédé suivant :

Un chauffage à 100° pendant *une minute* me permit d'abord d'opérer une sélection entre les différents microbes qui pullulaient dans le liquide prélevé. — Les spores du *B. orthobutylicus* résistent en effet à cette température. Le liquide ainsi chauffé provoquait une fermentation rapide de tranches de pommes de terre cuites placées dans des tubes à essai dans lesquels on faisait le vide. Il était au contraire sans action sur le même milieu, ayant le libre accès de l'air.

Le bacille était donc un anaérobie vrai. Ni les tubes d'Es-march, ni ceux de Vignal, à base de gélatine nutritive, ou sucrée, ou additionnée d'amidon cuit, ne m'ont donné de développement ; il en fut de même de l'emploi de la gélose. Force me fut de revenir aux tranches de pommes de terre elles-mêmes.

Un peu de liquide fut prélevé à l'extrémité d'un fil de platine flambé, et ensemencé par stries, sans recharger le fil, sur plusieurs tranches de pommes de terre placées dans des tubes de Roux. Après y avoir fait le vide, ces tubes furent portés à l'étuve à 33°. Au bout de quelques jours, chaque point touché par le fil donnait naissance à une trace épaisse et confluyente, de couleur

blanchâtre, allant en diminuant d'épaisseur dans les derniers tubes, au point de ne plus présenter que des colonies isolées. Une de ces colonies, diluée dans de l'eau stérilisée, futensemencée de nouveau de la même manière, et l'opération fut recommencée une troisième fois. On n'avait plus à la fin que des colonies pures d'un bacille qui présentait les caractères suivants :



Fig. 1.

Bacille jeune. | Bacille vieux.

MORPHOLOGIE. — Le *B. orthobutylicus* se présente au microscope sous forme de bâtonnets cylindriques arrondis aux extrémités, et mesurant $3\ \mu$ à $6\ \mu$ de long sur $1,5\ \mu$ de large. Lorsqu'il est jeune, il n'est pas rare de rencontrer dans les préparations des bacilles renflés à leur extrémité en battant de cloche. Cette forme disparaît à mesure que le bacille avance en âge, et, dans les fermentations vieilles d'une semaine environ, on ne rencontre plus que la forme droite mais munie de spores. Celles-ci sont généralement au nombre de 2 à 3 et se distinguent du protoplasma par leur plus grande réfringence. Cette sporulation correspond à la cessation des mouvements du microbe, qui, lors-

qu'il est jeune, est doué d'une mobilité extrême, dans les milieux privés d'oxygène.

Ces caractères rapprochent beaucoup le *B. orthobutylicus* du *Bacillus butyricus* de M. Pasteur et du *Bacille amylozyme* de M. Perdrix ; mais, comme nous le verrons tout à l'heure, il s'en distingue par ses fonctions physiologiques.

FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES. — Le *B. orthobutylicus* ne se développe pas dans les solutions laissées au contact de l'air.

Ses spores résistent à une température de 80° pendant dix minutes ; à 85° elles sont détruites.

Il fait fermenter les substances suivantes : glycérine, mannite, glucose et sucre interverti, saccharose, maltose, lactose, galactose, arabinose, amidon et pommes de terre, dextrine, inuline.

Il est sans action sur le tréhalose, l'érythrite, le glycol, le lactate de chaux, le tartrate de chaux, la gomme arabique.

Ses produits de fermentation sont :

L'alcool butylique normal avec un peu d'alcool isobutylique ;

L'acide butyrique normal ;

L'acide acétique, et dans quelques circonstances un peu d'acide formique.

Les gaz dégagés sont formés d'acide carbonique et d'hydrogène.

Il offre de plus les particularités suivantes :

a) Il fait fermenter le *saccharose*, le maltose et le lactosé sans les intervertir ;

b) Il transforme entièrement l'amidon en maltose et en dextrine, mais cette dernière est transformée en maltosé au fur et à mesure de sa production : aussi ne peut-on déceler sa présence dans le cours de la fermentation ;

c) Il transforme la dextrine en maltose au moyen d'une diastase spéciale ;

d) Il attaque directement l'inuline sans la transformer en lévulose.

DISTINCTION AVEC LES AUTRES FERMENTS BUTYRIQUES. — Le *B. orthobutylicus* se distingue du *Bacillus butyricus* de Pasteur et du *B. amylobacter* de Van Tieghem en ce qu'il ne fait pas fer-

menter le lactate de chaux et qu'il n'attaque pas la cellulose. De plus, il ne se colore en bleu par l'iode à aucune période de son développement. Il se différencie du *Bacillus butylicus* de Fitz par la faculté qu'il a de faire fermenter le lactose et l'amidon, et de ne pas intervertir le saccharose. Enfin la propriété qu'il possède de donner de l'alcool butylique normal avec les divers hydrates de carbone le sépare nettement du *Bacille amylozyme* de Perdrix.

MÉTHODES DE CULTURES. — Je me suis servi, pour mes cultures, du liquide suivant qui diffère peu de celui qu'employait M. Pasteur, dans ses expériences sur la fermentation du tartrate de chaux :

Liquide nutritif.

Phosphate d'ammoniaque	0 ^{gr} ,40
Sulfate de magnésie.	0 ^{gr} ,40
Phosphate de potasse	0 ^{gr} ,20
Sulfate d'ammoniaque	0 ^{gr} ,20
Nitrate de potasse.	0 ^{gr} ,20
Peptone sèche	2 ^{gr} ,50
Eau.	1 litre.

C'est dans ce liquide que je faisais dissoudre la substance fermentescible dans les proportions de 3 à 5 0/0.

Vases employés pour les cultures. — Un matras d'une capacité variant de 500 c. c. à 2 litres était muni d'un bon bouchon de caoutchouc percé de deux trous ; dans l'un de ces trous s'engageait à frottement dur un tube de verre droit descendant presque jusqu'au fond du matras ; dans l'autre trou un autre tube de verre, affleurant l'orifice inférieur du bouchon, était recourbé deux fois sur lui-même, de façon à ce que son extrémité arrivât presque au niveau de la base du ballon. Le tube droit était garni d'un petit tampon de coton et recouvert d'un tube en caoutchouc fermé par une baguette de verre. Le ballon étant rempli entièrement de liquide, on adaptait le bouchon qu'on fixait solidement au moyen d'une ficelle. On faisait alors plonger le tube recourbé dans un vase contenant le même liquide que le ballon et dont l'orifice était garni d'un tampon de coton.

Stérilisation. — D'autre part, une autre portion de ce même liquide était mise de côté et partagée en deux parties : l'une qui

servait à l'analyse, l'autre qu'on introduisait dans des tubes à essai garnis de coton. Chaque tube en renfermait de 5 c. c. à 10 c. c. Le ballon, les tubes à essai et l'échantillon étaient ensuite stérilisés à l'autoclave à 120°, pendant un temps qui variait de 15 minutes à 3/4 d'heure, suivant le volume des vases.

Dans cette opération, une partie du liquide du ballon était refoulée dans le vase par l'air expulsé, mais lors du refroidissement, un vide partiel se produisant, le liquide du vase faisait retour au ballon et le remplissait entièrement, sans courir le risque d'être contaminé, grâce au tampon de coton. Le ballon refroidi était ensuite porté dans l'étuve à 35°, où il restait en observation pendant plusieurs jours avant d'être ensemencé.

Ensemencement. — Une colonie isolée était prélevée au moyen d'un fil de platine flambé sur une tranche de pomme de terre et portée aussitôt dans l'un des tubes à essai contenant le même liquide que le ballon à ensemenecer. Ce tube était ensuite étiré à sa partie moyenne. Le coton qui le fermait était flambé avec soin et refoulé jusqu'à l'étranglement du tube, puis on étirait en pointe la partie supérieure de manière à pouvoir l'engager dans le caoutchouc d'une trompe à eau. Le vide étant fait, on fermait le tube à la lampe dans sa partie étirée et on le portait à l'étuve.

Vingt-quatre ou quarante-huit heures après, la fermentation étant active, on sortait le tube de l'étuve et, présentant sa pointe effilée à la flamme d'un bec de Bunsen, on laissait échapper les gaz et on recueillait une petite quantité de liquide au moyen d'un tube effilé et flambé. C'est là la semence destinée à ensemenecer le grand ballon.

Pour cela, on ôte avec précaution le tube de caoutchouc qui coiffe le tube droit; on flambe le coton qui le ferme et on le remplace par un autre préalablement stérilisé. D'autre part, on brise avec des pinces flambées l'extrémité de la pipette contenant la semence, et on l'introduit dans le tube droit en soulevant le coton. Il ne reste plus qu'à remettre le coton en place ainsi que le tube de caoutchouc, que pour plus de sûreté on remplace par un autre, stérilisé dans une solution de sublimé au millièrre.

On reporte alors le ballon à l'étuve, en prenant soin de faire plonger l'extrémité du tube recourbé dans un verre contenant du mercure, pour éviter toute communication entre l'atmosphère et le liquide.

DOSAGE DES PRODUITS DE LA FERMENTATION. — Pour doser l'alcool, les acides et les gaz provenant de la fermentation, nous avons suivi une marche qui varie un peu suivant que la fermentation s'est effectuée en présence ou en l'absence de carbonate de chaux.

A. *Fermentation en présence de carbonate de chaux.* — Le liquide est filtré au papier. Une petite portion est mise à part pour l'examen polarimétrique, le titrage de la substance restante, la détermination de l'extract sec et le dosage de la chaux à l'état de sel. Un volume déterminé du liquide filtré est distillé pour recueillir l'alcool, qu'on ramène, par des distillations successives, à un petit volume (50^{cc} à 100^{cc}).

Le résidu est additionné d'une quantité d'acide oxalique suffisante pour précipiter la chaux. On laisse reposer 24 heures et l'on sépare l'oxalate de chaux formé; sur le liquide filtré, on procède à la détermination qualitative des acides volatils, d'après la méthode de M. Duclaux¹.

Le reste du liquide est évaporé en consistance sirupeuse pour chasser complètement les acides volatils, puis traité par l'éther pour la recherche de l'acide lactique. L'éther évaporé, le résidu est repris par l'eau et examiné au polarimètre, finalement saturé par l'oxyde de zinc et évaporé.

Quant au carbonate de chaux resté au début sur le filtre, on le décompose par l'acide chlorhydrique et l'on agite la solution avec un mélange d'alcool et d'éther pour rechercher l'acide succinique. Disons tout de suite que nous n'avons jamais constaté la présence de cet acide dans nos fermentations.

B. *Fermentation sans carbonate de chaux.* — Dans ce cas, on détermine d'abord l'acidité de la liqueur par un moyen quelconque, on la neutralise ensuite par la chaux, et on la traite ensuite comme tout à l'heure.

DÉTERMINATION DES ÉLÉMENTS. — A. *Nature de l'alcool formé.* — Dans la recherche de l'alcool, le liquide distillé se sépare en deux couches : une couche inférieure aqueuse, et une couche supérieure mobile à odeur forte rappelant celle de l'alcool amylique. Lorsque celle-ci n'était pas trop abondante, elle se dissolvait par agitation dans le liquide sous-jacent.

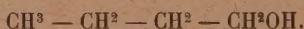
1. *Annales de Chimie et de Physique*, 6^e série, t. VIII, p. 542.

En appliquant à cette dissolution la méthode indiquée par M. Duclaux¹, j'ai pu recueillir d'utiles indications sur la nature de l'alcool produit. En effet, les différents échantillons recueillis dans la fermentation des corps suivants m'ont donné :

Nature de la fermentation.	Degré alcoolique à 15°.	Nombre de gouttes (5cc).	Théorie pour l'alcool butylique.
Amidon	4°	192	193
Pommes de terre	6°	226	224
Saccharose	5°5	219	217
Mannite	6°	224	224

Dans une autre expérience, cet alcool fut séparé au moyen d'une ampoule à robinet et desséché sur du carbonate de potasse pour prendre son point d'ébullition : une faible partie, environ un cinquième, passa entre 105° et 115°, et le reste à 116°.

Ce dernier chiffre correspond au point d'ébullition de l'alcool butylique normal :



La première portion (105 — 115°) était sans doute formée d'alcool isobutylique dont le point d'ébullition est de 108°.

Une solution à 5 0/0 en volume de l'alcool passant à 116° a été soumise à l'épreuve du compte-gouttes et m'a donné à 15° 209 gouttes, chiffre qui coïncide exactement avec le nombre donné par M. Duclaux. Dans ces conditions, je n'ai pas hésité à me servir, pour le dosage de l'alcool butylique de mes fermentations, de la table suivante, empruntée au travail de M. Duclaux².

Table pour le dosage de l'alcool butylique.

Nombre de gouttes à 15°.	Alcool en volume pour cent.
107,5	0,2
113,5	0,4
123	0,6
129	0,8
135	1,0
147	1,5
157	2.
168	2,5
177	3
193	4
209	5
224	6

1. *Annales de Chimie et de Phys.*, 3^e série, t. XIII.

2. *Loc. cit.*

239.	7
255.	8
270.	9
286.	10

Alcool éthylique. — Dans chaque essai, j'ai recherché l'alcool éthylique par la réaction de l'iodoforme, je ne l'ai rencontré que très rarement et à l'état de traces indosables.

B. Nature des acides volatils. — J'ai dit que les acides volatils étaient déterminés et dosés par la méthode des distillations fractionnées¹. Je les ai toujours trouvés formés d'un mélange en proportions variables d'acide acétique et d'acide butyrique. L'acide formique, qui pourrait gêner dans cette étude, n'existe jamais qu'en très petite quantité. Pour le déceler, on mettait à part les deux dernières prises pour les soumettre à l'essai du nitrate d'argent ammoniacal.

Quant à l'acide butyrique, il a été séparé de l'acide acétique au moyen de distillations fractionnées, en ne recueillant que les premières portions distillées, et transformé en sel de chaux. Une solution aqueuse de ce butyrate de chaux saturée à froid se prenait en masse cristalline quand on la chauffait. On sait que le butyrate normal de chaux est plus soluble à froid qu'à chaud.

Le dosage de l'eau dans le sel cristallisé vint confirmer cette première indication. Le butyrate normal correspond à la formule $(C^4H^7O^2)^2Ca + H^2O$, soit 7 gr. 758 0/0 d'eau de cristallisation, tandis que l'isobutyrate possède 5 molécules d'eau : $(C^4H^7O^2)^2Ca + 5H^2O$, soit 29 gr. 605 0/0. Or, 1 gr. 627 de butyrate de chaux, desséchés à 110° pendant 12 heures, m'ont donné une perte de 0 gr. 127, correspondant à 7 gr. 805 0/0 d'eau de cristallisation (au lieu de 7 gr. 758).

Enfin du butyrate de chaux sec décomposé par l'acide sulfurique m'a donné un liquide dont le point d'ébullition était de 160°, nombre qui correspond exactement au point d'ébullition de l'acide butyrique *normal*.

CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS. — Nous allons appliquer les données précédentes, en les développant, à l'examen d'une fermentation. Les détails dans lesquels nous allons entrer une fois pour toutes nous éviteront des répétitions inutiles dans

1. *Annales de Chimie et de Physique*, 6^e série, t. VIII, 542.

l'exposé de nos résultats, la même marche ayant été suivie pour chaque analyse des produits fermentés.

Fermentation du glucose.

Une solution de glucose pur et cristallisé, dans le liquide nutritif décrit plus haut (page 359) et renfermant 2^{gr},40 de glucose pour 100 centimètres cubes, est additionnée de carbonate de chaux, et ensemencée le 2 février 1892, avec une semence de *Bacillus orthobutylicus* âgée de 24 heures, et provenant d'un tube de glucose ensemencé lui-même la veille avec une colonie prise sur pomme de terre. La fermentation commence le lendemain, et est examinée 20 jours après, tout dégagement gazeux ayant cessé.

1° *Glucose consommé.* — 100 c. c. du liquide primitif renfermaient :

Glucose.	2 ^{gr} ,40
Après la fermentation	0 ^{gr} ,0

Proportion de glucose consommé = 100 0/0.

2° *Alcool.* — 1,000 c. c. sont distillés de manière à recueillir finalement 100 c. c. qui renferment tout l'alcool. Soumis au compte-gouttes, le liquide distillé donne 181 gouttes à 18°. Ce qui se réduit par correction à 180 gouttes à 15°. 180 gouttes à 15° correspondent à 3^{cc},2 d'alcool butylique pour 100 c. c. en volume. Soit en poids (3^{cc},2 \times 0,824) = 2^{gr},64. Ces 2^{gr},64 étaient en dissolution dans les 1,000 c. c. Par conséquent 100 c. c. du liquide fermenté renferment 0^{gr},264 d'alcool butylique.

La recherche de l'alcool éthylique, dans le liquide distillé, par la réaction de l'iodoforme, ne donne pas de résultat.

Acides. — Le titrage des acides est obtenu par le dosage de la chaux en solution. On opère sur 20 c. c. du liquide filtré par le procédé classique. 100 c. c. du liquide fermenté renfermaient 0^{gr},375 de chaux.

Le fractionnement des acides volatils par le procédé Duclaux, après précipitation de la chaux par l'acide oxalique, a donné le résultat suivant :

La colonne α représente pour chaque prise le nombre de centimètres cubes d'eau de chaux nécessaires pour saturer l'acide passé à la distillation ;

La colonne β donne le total de l'eau de chaux employée dans les 1, 2, 3... 8, 9, 10 premières prises;

La colonne A contient le rapport, à la quantité totale d'acide passé à la distillation, des quantités d'acide passées dans les 10, 20, 30, 40, etc., premiers centimètres cubes.

Enfin le rapport $\frac{b}{a}$, déduit des nombres fournis par M. Duclaux, représente le rapport entre les molécules d'acide butyrique et d'acide acétique.

	α	β	A	$\frac{b}{a}$
1.	17,6	17,6	14,5	2,1
2.	16,3	33,9	28,1	2,2
3.	15,0	48,9	40,5	2,3
4.	13,5	62,4	51,7	2,3
5.	12,4	74,8	62,0	2,5
6.	11,1	85,9	71,2	2,5
7.	10,0	95,9	79,5	2,6
8.	9,0	104,9	86,9	2,6
9.	8,1	113,0	93,6	2,5
10.	7,6	120,6	100,0	»

Le rapport $\frac{b}{a}$ étant sensiblement égal à 2,5, on en déduit que $\frac{a}{b} = \frac{1}{2,5} = \frac{2}{5}$.

Par conséquent les 0^{sr},375 de chaux se partageront entre l'acide acétique et l'acide butyrique dans les proportions de 2/5, c'est-à-dire que nous aurons :

0^{sr},107 de chaux pour l'acide acétique
et 0^{sr},268 — — — butyrique,

ce qui correspond à :

Acide acétique	0 ^{sr} ,229
Acide butyrique	0 ^{sr} ,842

En résumé, les 2^{sr},40 de glucose consommé ont donné :

Alcool butylique	0 ^{sr} ,264
Acide acétique	0 ^{sr} ,229
Acide butyrique	0 ^{sr} ,842

La mise en équation de ces données conduit sensiblement à la formule



d'après laquelle on a pour 1 gramme de glucose :

		Trouvé.
Alcool butylique	0,117	0,110
Acide acétique	0,095	0,095
Acide butyrique	0,349	0,350

ANALYSE DES GAZ. — Pour analyser les gaz dégagés pendant la fermentation, on aurait pu les recueillir en plaçant une éprouvette sur le mercure dans lequel plongeait l'extrémité du tube inférieur des ballons, recourbé à cette intention. La quantité considérable de gaz produits rendait cette manipulation difficile et lui ôtait toute précision.

Voici le dispositif que j'ai employé : Dans un ballon à col étroit de 200 c. c., j'introduisais de 20 à 50 c. c. de la solution à faire fermenter, préalablement titrée, et après avoir fermé l'extrémité du tube au moyen d'un tampon de coton, je stérilisai le tout à l'autoclave. Le liquide refroidi, ensemencé par les procédés ordinaires, le col du ballon était légèrement étranglé au-dessous du coton; celui-ci, flambé avec soin, était refoulé jusqu'à l'étranglement; puis, l'extrémité libre du col étirée à la lampe, on portait le ballon ainsi disposé dans une étuve de Roux réglée à 35°, et on le reliait à une trompe à mercure de Schlœsing au moyen d'un mince tube de plomb pénétrant dans l'étuve par une étroite ouverture.

Le vide étant fait, la fermentation ne tardait pas à s'établir. Les gaz étaient recueillis au moyen de la trompe de Schlœsing dans une éprouvette graduée et portés sur la cuve à mercure où on les analysait par les procédés ordinaires.

Je n'ai jamais constaté dans les fermentations du *Bacillus orthobutylicus* que la présence de deux gaz : l'acide carbonique et l'hydrogène.

Mais ces deux gaz n'y existent jamais en proportions constantes. En général, l'hydrogène diminue depuis le commencement jusqu'à la fin de la fermentation, et inversement l'acide carbonique augmente.

Cette variation dans la composition du mélange gazeux doit correspondre à des changements dans les transformations chimiques. C'est ce que nous allons essayer de démontrer.

II

INFLUENCE DE LA RÉACTION DU MILIEU. — Le *Bacillus orthobutylicus*, comme nous l'avons dit, produit de l'acide butyrique et de l'acide acétique. Ces acides, en s'accumulant dans la liqueur, doivent à un certain moment arrêter la fermentation. C'est ce qui arrive si l'on n'a pas soin d'ajouter dans les ballons du carbonate de chaux. Il nous a paru intéressant de rechercher l'influence exercée par cette acidité sur les fonctions du microbe et de déterminer en même temps la dose d'acide capable d'entraver la fermentation. Cette quantité n'a rien d'absolu. Elle varie avec la nature du corps qui fermente, et pour une même substance elle est influencée par divers facteurs au nombre desquels il faut certainement compter l'âge et l'activité de la semence, et sans doute aussi la proportion d'alcool formé, qui, toutes choses égales, est d'autant plus abondante que l'acidité est plus faible. Aussi est-il assez difficile de déterminer si l'arrêt d'une fermentation est dû à l'acidité seule de la liqueur ou à la somme des produits empêchants fabriqués par le bacille. C'est ce qui ressort du tableau suivant dans lequel on voit que l'acidité n'est nullement en rapport avec la quantité de matière consommée.

Dans ce tableau, l'acidité est exprimée en acide butyrique par litre et les résultats se rapportent tous à des fermentations sans carbonate de chaux arrêtées spontanément.

Concentration de 2 à 3 ‰.

Nature de la substance fermentée.	Acidité par litre en acide butyrique.	Proportion ‰ de substance consommée.
Glycérine	1 ^{er} ,40	29 ‰
Empois d'amidon . .	1 ^{er} ,44	50 ‰
Glucose	1 ^{er} ,58	52 ‰ ¹
—	1 ^{er} ,76	39 ‰ ²
Mannite	1 ^{er} ,85	50 ‰
Pommes de terre . .	2 ^{es} ,08	?
Saccharose	2 ^{es} ,20	45 ‰
Dextrine	2 ^{es} ,55	23 ‰
Inuline	2 ^{es} ,76	40 ‰

1. Semence de 8 jours.

2. Semence de 1 jour.

Concentration de 4 à 5 ‰.

Sucre interverti . . .	1gr,66	39 ‰
Dextrine	2gr,48	16 ‰

La fermentation s'arrête donc quand le milieu renferme de 1gr,40 à 2gr,76 d'acide butyrique par litre. On peut néanmoins obtenir une fermentation complète en diminuant suffisamment la concentration de la liqueur. Exemple :

Glucose à 1 ‰ . . .	1gr,49	100 ‰
---------------------	--------	-------

Le rapport entre les divers produits de la fermentation varie aussi avec la réaction du milieu. En général on constate une augmentation d'alcool butylique quand le milieu s'acidifie, et une diminution de l'acide butyrique; l'acide acétique varie à peine. Au contraire, quand le milieu est maintenu neutre par addition de carbonate de chaux, c'est l'acide butyrique qui l'emporte sur l'alcool, et la fermentation peut devenir complète.

Dans le tableau suivant, les nombres se rapportent à 1 gramme de matière fermentée. Le rapport $\frac{a}{b}$ est le rapport entre l'acide acétique et l'acide butyrique, exprimé en poids atomiques :

		Alcool butylique.	Acide acétique.	Acide butyrique.	$\frac{a}{b}$
Glucose	Sans craie.	0,329	0,072	0,070	1 : 0,66
	Avec craie.	0,110	0,095	0,350	1 : 2,5
Glucose	Sans craie.	0,316	0,040	0,020	1 : 0,33
	Avec craie.	0,155	0,044	0,322	1 : 5
Sucre interverti.	Sans craie.	0,329	0,094	0,0	1 : 0
	Avec craie.	0,069	0,100	0,366	1 : 2,5
Glycérine	Sans craie.	0,643	0,026	0,153	1 : 4
	Avec craie.	0,075	0,025	0,228	1 : 7
Pommes de terre	Sans craie.	0,280	0,077	0,088	1 : 0,66
	Avec craie.	0,042	0,092	0,819	1 : 6
Inuline	Sans craie.	0,027	0,035	0,310	1 : 6
	Avec craie.	0,036	0,051	0,454	1 : 6

Ainsi, non seulement la réaction du milieu a une influence sur la terminaison de la fermentation; mais on peut voir déjà

quels troubles profonds elle amène dans la transformation de la molécule qui fermente. Il semble que la cellule dans un milieu acide devienne moins apte à former de l'acide butyrique et que, par suite d'une sorte de compensation, cette diminution de l'acide corresponde à une augmentation de l'alcool. C'est d'ailleurs ce que nous constaterons par la suite chaque fois qu'une cause quelconque viendra entraver le libre développement du ferment.

Remarque. — La chaleur de formation d'une molécule de glucose à l'état dissous étant de $+ 302$ calories, si l'on suppose que cette molécule se décompose en donnant seulement de l'acide butyrique, on aura :



Si, au contraire, c'est l'alcool butylique seulement qui prend naissance on aura :



Par conséquent, la formation d'alcool butylique aux dépens du glucose, dégage une plus grande quantité de chaleur que la formation d'acide butyrique, et fournit ainsi une plus grande quantité d'énergie aux cellules du ferment.

Est-ce à cette particularité qu'il faut attribuer l'augmentation de la production d'alcool quand le bacille se trouve gêné dans son évolution, ou bien quand il agit dans un milieu dépourvu de carbonate de chaux?

Voyons ce qui se passe dans un liquide additionné de craie.

La chaleur de formation du butyrate de chaux étant de $+ 13^{\text{cal}},7$, si on retranche de ce nombre la chaleur de formation de $1/2$ molécule de carbonate de chaux $= + 9^{\text{cal}},8$ il restera $3^{\text{cal}},9$ à ajouter aux $14^{\text{cal}},6$ trouvées précédemment. La décomposition du glucose en présence de carbonate de chaux dégagera donc $18^{\text{cal}},5$ au lieu de $14^{\text{cal}},6$.

Ici encore la différence entre la chaleur dégagée par la production de l'alcool butylique aux dépens du glucose et la chaleur produite par la formation de l'acide butyrique est encore considérable, et si, dans le cas d'addition de carbonate de chaux, on constate la formation d'une plus grande quantité d'acide et une

diminution de l'alcool, la cause n'en peut être attribuée à des phénomènes thermochimiques, mais plutôt, selon nous, à ce fait que l'acide étant saturé au fur et à mesure de sa formation cesse de devenir une cause empêchante pour le développement du microbe.

INFLUENCE DE LA DURÉE DE LA FERMENTATION. — Existe-t-il pendant toute la durée d'une fermentation un rapport constant entre le poids de la substance détruite et les divers produits qui résultent de cette destruction ?

Si ce rapport varie, dans quel sens se fait cette variation ? et sous quelles influences ? Telles sont les questions que nous nous sommes proposé de résoudre.

Nous avons employé comme milieu de culture le glucose et le sucre interverti en solution à 5 0/0 environ, en opérant tantôt en présence, tantôt en l'absence de carbonate de chaux. Les ballons de la même série étaientensemencés en même temps avec la même semence âgée au plus de 2 jours, afin d'éliminer certaines causes de perturbation dont nous aurons bientôt à nous occuper.

Nous signalerons tout de suite les différences considérables qui existent entre les fermentations du glucose et celles du sucre interverti. Nous trouverons bientôt l'explication de cette anomalie, due à la présence du lévulose qui offre une résistance notable à l'action du ferment.

A. — Première série d'expériences.

GLUCOSE ADDITIONNÉ DE CRAIE

Concentration de la solution = 4gr,75 0/0.

	2 jours.	4 jours.	20 jours.
Poids 0/0 de glucose consommé.	42,8 0/0	49 0/0	61,2 0/0
1 gramme de glucose donne :			
Alcool butylique.	0,148	0,135	0,155
Acide acétique. .	0,091	0,078	0,043
Acide butyrique.	0,331	0,345	0,322
Acide formique.	Traces.	0	0
Rapport $\frac{a}{b}$	$\frac{1}{2,5}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{5}$

B. — Deuxième série d'expériences.

SUCRE INTERVERTI ADDITIONNÉ DE CRAIE

Concentration de la solution = 5^{gr},85 ‰.

	1 jour.	4 jours.	16 jours.	8 mois.
Quantité ‰ de sucre con-sommé	15 ‰	43 ‰	56 ‰	90 ‰
1 ^{er} sucre interverti donne :				
Alc. butylique.	0,015	0,039	0,069	0,108
Ac. acétique. .	0,313	0,114	0,110	0,046
Ac. butyrique.	0,464	0,423	0,405	0,275
Rapport $\frac{a}{b}$. . .	$\frac{1}{1}$	$\frac{2}{5}$	$\frac{2}{5}$	$\frac{1}{4}$

C. — Troisième série d'expériences.

GLUCOSE SANS CRAIE

Concentration de la solution = 4^{gr},75 ‰.

	2 jours.	4 jours.	20 jours.
Quantité ‰ de glucose con-sommé.	20 ‰	22,5 ‰	26,3 ‰
1 ^{er} de glucose donne :			
Alcool butylique.	0,254	0,308	0,316
Acide acétique. .	0,039	0,040	0,040
Acide butyrique.	0,074	0,040	0,020
Acide formique.	Fortes traces.	Traces.	Traces.
Rapport $\frac{a}{b}$	$\frac{3}{4}$	$\frac{3}{2}$	$\frac{3}{1}$

D. — Quatrième série d'expériences.

SUCRE INTERVERTI SANS CRAIE

Concentration de la solution = 5^{gr},35 ‰.

	1 jour.	4 jours.	16 jours.
Quantité ‰ de sucre con-sommé	3,7 ‰	22,4 ‰	22,4 ‰
1 ^{er} sucre donne :			
Alcool butylique.	0,093	0,295	0,329
Acide acétique. .	0,251	0,085	0,094
Acide butyrique.	0,245	0	0
Rapport $\frac{a}{b}$	$\frac{1}{0,66}$	$\frac{1}{0}$	$\frac{1}{0}$

Il ressort clairement de ces expériences que pendant toute la durée d'une fermentation, quelle que soit la réaction du milieu :

1° La quantité d'alcool butylique formé va en augmentant ;

2° Les quantités d'acide butyrique et d'acide acétique vont constamment en diminuant ;

3° Le rapport $\frac{a}{b}$ va en diminuant en milieu neutre, et en augmentant en milieu acide.

Ces résultats se trouvent confirmés par l'analyse des gaz dégagés pendant la fermentation. Nous avons effectué cette expérience, en nous entourant des précautions décrites page 366, sur 20 centimètres cubes d'une solution de glucose à 1,03 0/0,ensemencés sans addition de craie et placés à l'étuve à 35°. Au bout de 22 jours, il ne se dégage plus rien. L'analyse montre que tout le glucose est consommé.

Analyses des gaz dégagés.

Durée.	Volume total à 0° et 760 ^{es} .	CO ₂	H	Rapport en volume. $\frac{H}{CO_2}$
4 ^e jour	21 ^{cc} ,66	10 ^{cc} , »	11 ^{cc} ,66	$\frac{53,8}{46,2}$
13 ^e jour	44 ^{cc} , »	32 ^{cc} ,76	11 ^{cc} ,24	$\frac{25,5}{74,5}$
22 ^e jour	8 ^{cc} ,80	6 ^{cc} ,90	1 ^{cc} ,90	$\frac{21,5}{78,5}$
TOTAL.	74 ^{cc} ,46	49 ^{cc} ,66	24 ^{cc} ,80	$\frac{333}{666}$

La marche du dégagement des gaz et les variations du rapport $\frac{H}{CO_2}$ indiquent une augmentation continue dans la formation de l'alcool butylique.

En effet, supposons qu'il ne se forme que de l'acide butyrique. La réaction la plus simple sera :



Le rapport en volume $\frac{H}{CO_2}$ sera égal à $\frac{50}{50}$.

Si au contraire il ne se forme que de l'alcool on aura :



Et le rapport $\frac{H}{CO_2}$ deviendra $\frac{0}{100}$. Il n'y aura pas d'hydrogène.

Or nous voyons précisément, dans l'expérience précédente,

l'hydrogène diminuer jusqu'à la fin de la fermentation, preuve que la seconde équation l'emporte peu à peu sur la première et que l'alcool se forme en quantité croissante. Quant à l'acide acétique, sa formation ne peut apporter de trouble dans le rapport des gaz dégagés, puisque l'équation la plus simple de cette formation serait :



Dans le cas particulier qui nous occupe, nous remarquons que le rapport moyen entre la totalité des gaz dégagés est de $\frac{33,3}{66,6}$ pour $\frac{H}{CO^2}$ en volume. C'est précisément le nombre que l'on trouve en appliquant la formule suivante :



et en supposant qu'il ne s'est pas produit d'acide acétique.

Il faut d'ailleurs remarquer que nous n'avons opéré que sur une solution de très faible concentration (1 0/0) permettant au glucose d'être transformé intégralement quoique en milieu acide.

Mais cette équation ne s'appliquerait plus à des solutions plus concentrées : elle n'aurait pas été la même dans la même expérience, si nous l'avions interrompue avant que tout le sucre n'eût disparu. Dans les expériences qui précèdent, on pourrait calculer, pour chacune des phases étudiées des diverses fermentations, une formule spéciale, la résumant lorsqu'elle est arrivée à ce point, mais ne représentant ni son état antérieur, ni son état ultérieur, de sorte que chacune de ces équations n'a qu'une existence transitoire et ne représente qu'à un seul moment la réalité des choses.

On ne peut donc assigner une formule unique à une fermentation. La mise en équation du phénomène, souvent impossible au début de l'expérience, varie presque journellement en tendant vers une simplification qu'elle atteint lorsque toute la substance fermentescible est consommée. Il suffit, pour s'en convaincre, de comparer les fermentations de glucose à 3 0/0 dont le glucose a complètement disparu avec les fermentations de la même substance à 5 0/0 qui, au bout du même temps, renferment encore 30 0/0 de sucre non attaqué.

Cette variation dans l'équation de la fermentation suit une marche régulière, nous venons de le démontrer. La cause doit

en être recherchée dans l'accumulation des produits formés dans la liqueur. Les jeunes cellules qui éclosent dans ce milieu de moins en moins favorable, doivent se ressentir, durant leur évolution, des mauvaises conditions de leur naissance et se trouver moins armées pour la lutte.

Une fermentation sera donc d'autant plus régulière que la concentration sera plus faible.

Un autre point se dégage encore de nos expériences. C'est que l'acide formique, que l'on rencontre parfois au début des fermentations, disparaît dans le courant de celles-ci quand le milieu est neutre. Mais on le retrouve, quelquefois même après 20 jours, quand le milieu conserve sa réaction acide. On peut donc considérer l'acide formique comme un produit de souffrance. Je dois dire que je ne l'ai jamais rencontré qu'à l'état de traces. La destruction de l'acide formique par la cellule qui lui a donné naissance est un fait qui a été déjà mis en lumière par M. Duclaux (*Annales de l'Institut Pasteur*, VI, 593) et que nos résultats ne font que confirmer.

INFLUENCE DE L'ÂGE DE LA SEMENCE. — Si l'on ensemence des spores de *Bacillus orthobutylicus* dans une série de tubes de glucose, et qu'on examine ces cultures à divers intervalles, on remarque, au bout de 24 heures, des bacilles jeunes, très mobiles, en forme de battants de cloche, mélangés à des spores non germées; huit jours après, les bacilles toujours mobiles présentent leurs formes ordinaires; puis au fur et à mesure que la culture vieillit les mouvements cessent et les spores se forment¹. A ces phases successives dans l'existence du bacille doivent correspondre des périodes variables d'activité. C'est ce que nous venons de démontrer dans le chapitre précédent. Pendant toute la durée d'une fermentation, les produits formés varient de quantité en suivant une marche assez régulière.

Si donc on prélève, dans des cultures d'âge différent, des bacilles doués par conséquent d'activité différente, et qu'on les ensemence dans des milieux fermentescibles, ces bacilles, en s'y développant, produiront-ils tous la même fermentation, ou bien agiront-ils chacun avec leur activité propre? En un mot, quelle sera l'influence de l'âge de la semence sur la fermentation ?

1. Voir fig. 1 et 2, page 357.

Pour répondre à la question, une colonie, prise sur pomme de terre, est portée aussitôt dans une série de tubes de glucose.

Le lendemain, on ensemence, avec un de ces tubes, un ballon contenant une solution à 2,54 0/0 de glucose additionné de craie, et un autre sans craie.

La semaine d'après on répète la même opération avec un autre tube âgé de 8 jours et l'on attend ensuite quarante-cinq jours avant de faire un nouvel ensemencement. Tous les ballons sont ensuite examinés au bout de vingt jours.

Voici les résultats de cette première série d'expériences :

Première série d'expériences.

AVEC UNE SEMENCE CULTIVÉE SUR GLUCOSE

1° Glucose additionné de craie.

1 gramme de glucose a donné :	AGE DE LA SEMENCE		
	1 jour.	8 jours.	45 jours.
Alcool butylique	0,110	0,173	0,139
Acide acétique	0,093	0,181	0,100
Acide butyrique	0,330	0,177	0,221
Rapport $\frac{a}{b}$	$\frac{2}{5}$	$\frac{3}{2}$	$\frac{2}{3}$

2° Glucose sans craie.

1 gramme de glucose a donné :	1 jour.	8 jours.
Alcool butylique	0,329	0,368
Acide acétique	0,072	0,039
Acide butyrique	0,070	0,033
Rapport $\frac{a}{b}$	$\frac{3}{2}$	$\frac{2}{1}$

L'expérience a duré 20 jours. Tout le sucre avait disparu dans les ballons avec craie, il n'en avait fermenté que 52 0/0 dans le second ballon sans craie.

L'activité initiale de la semence communique donc son influence à la génération qu'elle produit. Nous voyons qu'en se plaçant au point de vue de la production d'alcool butylique, cette activité croît pendant les premiers jours pour décroître ensuite au fur et à mesure de la formation des spores. La production d'acide butyrique suit exactement une marche inverse. Son minimum correspond au maximum de l'alcool butylique.

On peut aussi penser qu'une semence subira une modification

d'autant plus rapide que le milieu de culture sera plus fermentescible, c'est-à-dire que la durée de son évolution sera plus courte.

Par conséquent, si nous cultivons notre bacille dans des tubes renfermant de la bouillie de pomme de terre, milieu qu'il fait fermenter avec une grande énergie, et si nous nous servons de ces nouvelles cultures pour ensemençer des ballons de glucose, nous devons obtenir des différences encore plus marquées que dans la première série.

Nous avons opéré comme ci-dessus, en remplaçant les tubes de glucose par des tubes de bouillie de pomme de terre qui nous ont servi à ensemençer des ballons contenant une solution à 3 0/0 de glucose, après 24 heures, 8 jours et 15 jours.

Les fermentations ont été examinées, comme précédemment, au bout de 20 jours, et nous ont donné les résultats suivants :

Deuxième série d'expériences.

SEMENCE CULTIVÉE SUR BOUILLIE DE POMMES DE TERRE

Glucose additionné de craie.

1 gramme de glucose donne :	AGE DE LA SEMENCE		
	1 jour.	8 jours.	15 jours.
Alcool butylique	0,209	0,083	0,030
Acide acétique	0,033	0,066	0,070
Acide butyrique	0,242	0,292	0,413
Rapport $\frac{a}{b}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{4}$
Proportion de glucose consommé	100 %	100 %	48,8 %

Nos prévisions se trouvent donc pleinement justifiées. Le bacille cultivé sur pommes de terre se trouve modifié plus rapidement dans ses fonctions que celui qui est cultivé sur glucose, et cela probablement à cause de la facilité avec laquelle il se multiplie dans un milieu amylacé.

Troisième série d'expériences.

Dans cette nouvelle expérience, j'ai préparé deux ballons de même volume renfermant la même solution de glucose additionnée de carbonate de chaux. Ces ballons sont munis chacun d'un tube de verre recourbé à angle droit permettant de les réunir au moyen d'un joint de caoutchouc. Ces tubes sont indé-

pendants des tubes à dégagement établis comme à l'ordinaire (voir page 359). Les ballons étant remplis exactement et stérilisés, sont réunis au moyen d'un joint de caoutchouc, et la communication entre les deux est interceptée par une pince à vis. Le premier ballon que nous désignerons par la lettre A estensemencé avec une culture prise sur glucose.

La fermentation ayant cessé au bout de 14 jours, on chasse, au moyen d'un insufflateur, un peu de liquide dans le second ballon B, qui se trouve ainsi recevoir une semence âgée de 14 jours, mais qui a poussé librement sous une pression égale à celle de l'atmosphère. Cette dernière fermentation est également examinée au bout de 14 jours.

La semence, ici, ne se trouve pas évidemment dans les mêmes conditions de développement que celle qui est cultivée dans des tubes à essai de petit volume et scellés à la lampe. Si l'on examine au microscope des bacilles pris après 14 jours dans les ballons, on en rencontre encore doués de mouvements, alors que dans les tubes, au bout du même temps, on ne trouve plus que des spores.

C'est sans doute que, dans ce dernier cas, le bacille n'a à sa disposition que 0 gr. 30 de glucose environ, tandis que dans nos ballons de deux litres, il se trouve en présence de 60 grammes de la même substance. Néanmoins, nous allons voir entre les produits de la fermentation des deux ballons, une différence très sensible dans la quantité d'acide produit et dans le rapport entre les acides butyrique et acétique, tandis que le chiffre de l'alcool aura peu varié.

FERMENTATION DE GLUCOSE SANS CRAIE

Concentration de la solution	2gr,72 ‰	
Durée de la fermentation	14 jours.	
	Ballon A.	Ballon B.
Age de la semence. . .	1 jour.	14 jours.
Glucose consommé. . .	100 ‰	100 ‰
1 gr. de glucose donne :		
Alcool butylique . . .	0,137	0,130
Acide acétique . . .	0,055	0,086
Acide butyrique . . .	0,323	0,254
Rapport $\frac{a}{b}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$

En résumé, quelle que soit la cause agissante (modification physiologique, telle que la formation des spores, ainsi que l'a remarqué M. Perdrix chez le *bacille amylozyme*, ou bien accumulation dans le milieu de culture des produits de la fermentation) l'âge d'une semence a une importance capitale dans la marche d'une fermentation.

INFLUENCE DE L'ÉDUCATION DE LA SEMENCE. — Nous avons déjà vu que l'origine de la semence peut amener des changements dans la fermentation. C'est ainsi que les spores du bacille, développées d'abord sur de la bouillie de pommes de terre avant d'être ensemencées sur glucose, acquièrent la propriété de donner de l'alcool en grande quantité dans ce dernier milieu, pourvu toutefois que l'ensemencement ait lieu dans les 24 heures. Plus tard, nous savons que cette faculté diminue à mesure que la semence vieillit.

Ce fait semble général, et nous en voyons une confirmation dans la fermentation du sucre interverti, qui donne des quantités variables d'alcool et d'acides suivant que la semence provient de pommes de terre ou d'une solution de sucre interverti.

Exemple :

Fermentation du sucre interverti.

Origine de la semence.	Alcool butylique.	Acide acétique.	Acide butyrique.	$\frac{a}{b}$
Pommes de terre .	0,105	0,062	0,368	$\frac{1}{3}$
Sucre interverti .	0,069	0,100	0,366	$\frac{2}{3}$

Il était intéressant de voir ce qu'on obtiendrait avec une semence habituée à vivre dans un milieu présentant avec le glucose des différences considérables dans sa fermentation.

Tel est le cas de l'inuline.

Nous verrons bientôt que le *B. orthobutylicus* ne donne avec l'inuline que de très faibles quantités d'alcool, quelle que soit la réaction de la liqueur; si la semence est vieille, il peut même arriver que l'alcool fasse totalement défaut.

Un tel milieu semble remplir les conditions les plus favorables à nos recherches.

Le *B. orthobutylicus* habitué à vivre sur inuline, milieu dans lequel il ne produit que des traces d'alcool, conservera-t-il cette propriété quand on le transportera sur glucose ?

Pourra-t-on créer ainsi une sorte de race nouvelle ?

Pour résoudre la question, nous avons commencé par cultiver le bacille en série sur inuline, en laissant un intervalle de 8 jours entre deuxensemencements.

Nous faisons usage, pour ces cultures successives, de tubes à essais renfermant 10 centimètres cubes d'une solution d'inuline à 2 0/0 additionnée de carbonate de chaux, et dans lesquels on faisait le vide.

Après 6 passages successifs, nous avonsensemencé, avec un de ces tubes en pleine fermentation, un ballon de glucose à 3 0/0 additionné de craie, ainsi qu'un tube à essai renfermant la même solution.

Celui-ci fut le point de départ d'une nouvelle série de cultures, sur *glucose* cette fois, répétées de 8 jours en 8 jours.

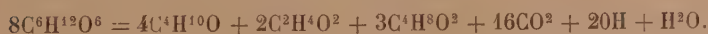
La sixième culture de cette série servit àensemencer un nouveau ballon de glucose et un ballon d'inuline.

Le ballon de glucose que nous avonsensemencé avec la culture provenant d'un 6^e passage sur inuline nous a donné les résultats suivants :

Glucose avec craie.

Concentration de la solution	3 0/0	
Durée de la fermentation	20 jours.	
Quantité de glucose consommé	100 0/0.	
1 gramme de glucose donne :		Calculé pour la formule ci-dessous.
Alcool butylique	0,205	0,205
Acide acétique	0,084	0,083
Acide butyrique	0,185	0,183
Rapport $\frac{a}{b}$	$\frac{2}{3}$	

Formule approchée de la réaction :



C'est-à-dire que l'on obtient une exaltation de la fonction alcool et une notable diminution dans la production d'acide butyrique. Ce chiffre 0,205 est en effet le plus élevé que nous ayons obtenu pour l'alcool dans toutes nos fermentations de glucose faites en présence de craie, si l'on excepte cependant une

fermentation provoquée par une semence, âgée de 24 heures, prise sur une culture de bouillie de pomme de terre. Et c'est une semence qui primitivement sur inuline ne donnait que 0 gr. 036 d'alcool butylique, qui en donne maintenant 0,205 sur glucose, après une série de passages sur un milieu spécialement réfractaire à la production de cet alcool! Mais cette semence nouvelle va-t-elle constituer une race et transmettre ses qualités à ses descendants?

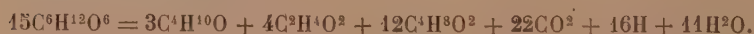
L'expérience va nous apprendre qu'il n'en est rien, et qu'au bout de plusieurs passages sur glucose, le bacille aura repris ses fonctions ordinaires; mais, chose curieuse, il aura acquis du même coup, dans ce nouveau milieu, la propriété de faire produire à l'inuline des quantités d'alcool butylique relativement considérables.

Fermentation de glucose avec craie.

ENSEMENCÉE AVEC UNE CULTURE AYANT SUBI SIX PASSAGES SUR INULINE
ET SIX PASSAGES SUR GLUCOSE

Concentration de la solution	4,67 %	
Durée de la fermentation	17 jours.	
Quantité pour cent de glucose consommée. .	47,1 %.	
1 gramme de glucose donne :		Calculé.
Alcool butylique.	0,084	0,082
Acide acétique.	0,091	0,088
Acide butyrique.	0,402	0,391
Rapport $\frac{a}{b}$	$\frac{1}{3}$	

Formule approchée :



Nous voici revenu à des chiffres sensiblement normaux, mais la même semence portée sur inuline nous donne :

Fermentation d'inuline (avec craie).

Concentration de la solution	3 %	
Quantité pour cent d'inuline consommée	90 %	
Durée de la fermentation.	49 jours.	
1 gramme d'inuline donne :		Calculé.
Alcool butylique	0,192	0,195
Acide acétique	0,106	0,105
Acide butyrique.	0,150	0,155
Rapport $\frac{a}{b}$	$\frac{1}{1}$	

Formule approchée :



Il y a là un effet inverse curieux à noter : le passage sur inuline exaltant les fonctions du ferment vis-à-vis du glucose, et, au contraire, le passage sur glucose rendant le bacille plus apte à faire fermenter l'inuline.

Comment chercher à expliquer ces faits? En supposant, ce qui est vraisemblable, que tous les bacilles d'une génération ne sont doués ni de la même activité ni de la même force de résistance, faut-il croire que, par une véritable sélection, ceux-là seuls subsistent qui peuvent résister à un milieu peu favorable comme l'inuline?

Une fermentation, en effet, est le résultat de la vie d'une foule d'individus, autrement dit est la somme des fermentations partielles produites par chacune des cellules du ferment prises isolément; on comprend dès lors que les résultats varient quand une cause quelconque vient retrancher de cette collectivité une catégorie de membres actifs. Dans le cas qui nous occupe, ce seraient précisément les individus les moins résistants qui disparaîtraient les premiers, ceux-là même qui, dans une solution de glucose, donneraient le minimum d'alcool, et qui, sur inuline, n'en donneraient plus du tout. Les autres, au contraire, subsisteraient avec toutes leurs qualités; aussi, reportés sur glucose, produiraient-ils dans ce milieu une augmentation apparente d'alcool butylique.

C'est par une hypothèse de même genre que M. Bordet ¹ cherche à expliquer l'exaltation du *Vibrio Metchnikovii* par son passage sur des cobayes vaccinés. Dans ce cas, la sélection se ferait par les phagocytes qui supprimeraient les individus moins armés pour la lutte, ne respectant que ceux qui sont doués d'une plus grande toxicité ou de chimiotaxie négative. « Grâce à cette sélection, les générations nouvelles de microbes dériveront pour la plus grande part des microbes qui auront été doués de ces propriétés favorables. »

Ne peut-on rapprocher ces faits de ce qui se passe chez d'autres microbes pathogènes?

1. J. BORDET. Adaptation des virus aux organismes vaccinés. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1892, p. 328.)

La bactériodie charbonneuse atténuée ne retrouve-t-elle pas sa virulence en passant par l'organisme du chien, animal doué de peu de réceptivité pour ce virus?

D'autres part, les travaux récents de M. Gessard ¹ nous ont montré que le *Bacille pyocyanique* ensemencé dans du bouillon donne à la fois un pigment fluorescent et de la pyocyanine. Mais si on le cultive exclusivement sur albumine, milieu dans lequel il ne produit que de la fluorescence, et qu'on le reporte ensuite sur le bouillon, il ne donnera plus de fluorescence, mais seulement de la pyocyanine, « comme s'il était devenu par habitude plus exigeant sur l'état où doivent lui être offerts les éléments de la production de la fluorescence. »

Dans le cas du passage sur glucose provoquant une fermentation plus active de l'inuline, la comparaison subsiste encore avec les microbes pathogènes.

N'est-ce pas par des inoculations successives de lapin à lapin que le virus de la rage atteint son maximum d'intensité?

Le rouget du porc, passant en séries sur le pigeon, augmente de virulence d'une façon absolue.

Et cependant, ni le lapin dans le premier cas, ni le pigeon dans le second, n'offrent de résistance à ces virus, mais, au contraire, présentent vis-à-vis d'eux une réceptivité toute particulière.

Quelle que soit l'explication qu'on voudra donner de ces faits, la conclusion à tirer de nos expériences, c'est que *le milieu dans lequel a vécu un ferment peut exercer une influence considérable sur l'activité de ce ferment.*

III

DOSAGE DES HYDRATES DE CARBONE. — Avant d'exposer les résultats de l'action du *Bacillus orthobutylicus* sur les différents milieux qu'il peut faire fermenter, je dirai brièvement les procédés d'analyse que j'ai employés pour doser les sucres et les matières amylacées.

Quand la solution ne contient qu'une seule matière sucrée, je l'ai dosée à la fois par la liqueur de Fehling et par le polari-

1. GESSARD, *Annales de l'Institut Pasteur*, V, 1891.

mètre, en tenant compte des résultats les plus récents sur la valeur du pouvoir rotatoire. Ces résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Saccharose ¹	$[\alpha]_D + 67^{\circ},31.$
Glucose anhydre ² . . .	$[\alpha]_D + 52^{\circ},50 + 0,018796p + 0,000517p^2.$
Lévulose anhydre ³ . .	$[\alpha]_D - 101^{\circ},38 - 0,56t + 0,108(p - 10).$
Sucre interverti . . .	$[\alpha]_D - 24^{\circ},22 - 0,28t.$
Lactose anhydre ⁴ . . .	$[\alpha]_D + 55^{\circ},30 + (20 - t) 0,55.$
Maltose anhydre ⁵ . . .	$[\alpha]_D + 140,375 - 0,01837p - 0,095t.$

Quand les dosages sont bien faits, les deux déterminations coïncident toujours.

Dans le cas d'un mélange de saccharose, de glucose et de lévulose, on a, pour résoudre le problème, trois éléments : rotation initiale de la solution et pouvoir réducteur avant et après interversion par un millièmed'acide sulfurique à l'ébullition.

Le procédé général pour doser un mélange de maltose et de glucose consiste de même à prendre la rotation initiale du mélange, à intervertir le maltose et à doser ensuite le glucose total.

Le maltose s'intervertit difficilement sous l'action des acides à 100°. Il faut, dans ce cas, prolonger l'ébullition. Il n'en est pas de même si l'on opère à 120°.

Dans ce cas, l'intervention a lieu en vingt minutes avec 2 0/0 seulement d'acide sulfurique ou d'acide chlorhydrique.

J'ai utilisé dans ce but l'autoclave à stérilisation en usage dans les laboratoires de microbie. Je me suis assuré, par des expériences préliminaires, que le glucose chauffé à 120° pendant une demi-heure avec 2 0/0 d'acide sulfurique, ne subit aucun changement sensible dans son pouvoir réducteur ou dans son pouvoir rotatoire.

Amidon et dextrine. — Un grand nombre de procédés ont été donnés pour doser la matière amylacée. Le plus simple est celui qui consiste à saccharifier l'amidon au moyen d'un acide minéral. — Sa transformation complète en glucose, quand on

1. A. GIRARD et DE LUYNES.

2. TOLLENS, *Ber. d. deut. chem. Geselsch.*, 1876, p. 487, 1831.

3. JUNGFLIEH et GRIMBERT, *Comptes rendus*, 1888, t. VII, p. 390.

4. SCHMEGER, *B. d. d. chem. Ges.*, 1880, p. 1915-2130.

5. MEISSL, *Journ. fur. prakt. Chemie* (2), XXV, p. 44.

opère à 100°, exige un temps fort long et une quantité d'acide assez notable, en même temps, que l'on risque d'altérer le sucre formé.

J'ai constaté qu'en opérant à 120°, dans l'autoclave qui nous a servi à intervertir le maltose, 50 c. c. d'une solution à 20/0 d'acide sulfurique ou chlorhydrique suffisent à saccharifier totalement deux à quatre grammes de fécule ou de dextrine en vingt minutes. Dans ces conditions, la cellulose n'est pas attaquée. Je me suis assuré que la transformation en glucose était complète, par la concordance des chiffres trouvés dans le dosage du glucose par réduction et par rotation. Le poids d'amidon ou de dextrine cherché est égal au poids de glucose trouvé, multiplié par 0,9.

Maltose et dextrine. — On sait que sous l'influence de l'amylase, l'empois d'amidon se dédouble en maltose et en dextrines, qui, d'après Effront ¹, auraient le même pouvoir rotatoire $=(\alpha)_j = +218^\circ$, ce qui correspond pour $(\alpha)_D$ à $(\alpha)_D = +193^\circ$ et ne réduiraient pas la liqueur de Fehling. Quoique ce dernier point ne soit pas admis par tous les auteurs, nous l'accepterons pour ne pas compliquer la méthode de dosage. L'erreur apportée dans les résultats par le pouvoir réducteur des dextrines est en effet d'un ordre très peu élevé.

L'expérience nous ayant montré que le sucre formé par l'action du *Bacillus orthobutylicus* sur l'empois d'amidon et sur la dextrine est du maltose sans mélange de glucose, nous n'avons eu à nous occuper que du dosage d'un mélange de maltose et de dextrine.

Deux procédés peuvent être employés :

Premier procédé. — Sur une portion de la liqueur on dose par réduction le maltose existant.

On chauffe ensuite une autre portion à 120° pendant vingt minutes avec 2 0/0 d'acide sulfurique et on dose le glucose formé. Du poids total de glucose on retranche celui qui résulte de l'intervention du maltose, et qu'on obtient en multipliant le poids de maltose trouvé par le facteur 1,0526. Le glucose restant correspond à la dextrine saccharifiée. En le multipliant par 0,9, on a le poids de dextrine contenue dans la solution.

1. *Moniteur scientifique*, 1887, p. 513.

2. $\frac{(\alpha)_D}{(\alpha)_j} = 0,886$.

Deuxième procédé. — Si toutes les dextrines possèdent le même pouvoir rotatoire, et si le nombre donné par Effront¹ est exact, on pourrait doser optiquement un mélange de dextrine et de maltose sans avoir recours à la saccharification.

Pour cela, on prend la déviation de la liqueur en notant avec soin la température. On dose le maltose par réduction. On en conclut la déviation correspondant au maltose. On la retranche de la déviation totale, le reste est la rotation due à la dextrine et il est facile d'en conclure le poids de cette substance.

La concordance entre les deux méthodes, que nous avons vérifiée dans un grand nombre d'expériences, semble, jusqu'à un certain point, confirmer les résultats obtenus par Effront.

FERMENTATIONS DES MATIÈRES AMYLACÉES. — Le *Bacillus orthobutylicus* attaque facilement les matières amylacées cuites, — empois d'amidon ou bouillie de pommes de terre. — Avec cette dernière, il n'est pas nécessaire de lui fournir le liquide nutritif habituel à base de sels minéraux et de peptone (page 359). L'eau suffit; le bacille trouve en effet dans les pommes de terre les matières protéiques et les sels nécessaires à sa nutrition.

La fermentation de l'amidon est précédée de transformations qu'il nous a paru intéressant d'étudier en détail.

Dans une première expérience, nous avons ensemencé un ballon d'empois de fécule de pomme de terre, à 5 0/0 environ, après l'avoir stérilisé soigneusement à l'autoclave, pendant 3/4 d'heure, à 120°. Dans cette étude des produits de la fermentation, nous n'avons pas ajouté de carbonate de chaux à l'empois, de façon à ne pas être gêné par la présence des sels de chaux.

Au bout de 7 jours nous enlevons le ballon de l'étuve. L'empois est entièrement liquéfié et séparé en deux couches: une couche limpide surnage une couche floconneuse sur laquelle je reviendrai.

La partie liquide filtrée, traitée par l'eau iodée, ne donne aucune coloration; additionnée de quatre fois son volume d'alcool, il ne se produit aucun trouble.

Il n'y a donc pas de dextrines.

Une étude comparative faite avec la liqueur de Fehling et le

1. *Loc. cit.*

polarimètre montre d'un autre côté qu'elle ne contient que du maltose. J'ai observé à plusieurs reprises le même fait.

L'absence de dextrine dans les expériences que nous venons de citer était un fait curieux dont il fallait rechercher la cause. La transformation de l'amidon en maltose avait-elle lieu sous l'influence d'une diastase? et cette diastase ne produisait-elle que du maltose?

Pour répondre à cette question, nous avons prélevé d'une fermentation de pommes de terre un certain volume de liquide que nous avons filtré aussitôt et qui, étudié au point de vue des diastases qu'il peut contenir, fluidifie l'empois d'amidon, en y produisant du maltose et de la dextrine comme le fait l'amylase du malt.

D'où vient donc que l'on ne peut retrouver de dextrine dans un milieu amylicé en cours de fermentation? Que devient la dextrine formée?

En faisant un dosage soigneux, on peut constater la présence de cette dextrine dans une fermentation à la condition de l'examiner à ses débuts.

Une fermentation de pommes de terre, sans carbonate de chaux, et âgée de deux jours, a été filtrée. Le liquide ne donnait pas de coloration par l'iode, mais précipitait faiblement par l'alcool.

Il renfermait :

Maltose	28 ^{gr} ,494 %
Dextrine.	0 ^{gr} ,423

Cette faible quantité de dextrine ne tarde pas à disparaître, et quand on examine une fermentation âgée, on ne trouve plus que du maltose sans dextrine. Si le milieu est additionné de craie, tout le maltose peut disparaître, si bien que le liquide filtré ne donne plus ni réduction ni déviation.

Comment se fait la disparition de la dextrine?

L'expérience va nous montrer que la dextrine fermente à son tour sous l'influence du *bacillus orthobutylicus*.

Fermentation de la dextrine. — Nous nous sommes servis, dans nos expériences, de dextrine blanche, colorable en pourpre par l'iode, entièrement soluble dans l'eau, ne renfermant pas plus de 0^{gr},3 pour cent de cendres et ne donnant avec le réactif cupro-potassique que des traces de réduction.

Cette dextrine, en solution dans le liquide nutritif de la

page 357, fermente facilement quand on l'ensemence avec le *Bacillus orthobutylicus*.

Une fermentation de cette nature, sans carbonate de chaux, examinée le cinquième jour, contenait 1 0/0 de dextrine et 3,20 0/0 de maltose.

Pour rechercher si cette transformation de la dextrine en maltose a lieu sous l'influence d'une diastase sécrétée par le bacille, nous avons ajouté à un même volume d'une solution de dextrine, 10 c. c. du liquide en fermentation additionné d'essence de moutarde, et 10 c. c. du même liquide préalablement chauffé à 100° pendant 5 minutes, afin de détruire la diastase, si elle existe.

Les deux flacons ont été portés à l'étuve à 35° et examinés le lendemain. Le liquide chauffé est resté ce qu'il était la veille. Dans le liquide non chauffé il y avait 27,7 0/0 de dextrine transformée en maltose.

Le *Bacillus orthobutylicus* sécrète donc une diastase capable de saccharifier la dextrine, soit qu'il vive dans le milieu dextrine, soit qu'il vive dans le milieu amidon.

En effet, une expérience faite dans les mêmes conditions que la précédente, en ajoutant à une solution de dextrine le liquide filtré d'une fermentation de pommes de terre, nous a donné 51 0/0 de dextrine transformée en 24 heures.

Inversement, le bacille qui a vécu sur le milieu dextrine produit une diastase capable de saccharifier l'amidon.

Dix centimètres cubes d'une solution de dextrine en fermentation ajoutée à de l'empois d'amidon, dans les mêmes conditions que ci-dessus, ont liquéfié cet empois au bout de deux jours, et le liquide filtré contenait 2,15 0/0 de maltose et 1,61 0/0 de dextrine.

Il est donc probable que la diastase sécrétée est unique; c'est une sorte d'amylase qui se différencie de l'amylase du malt par la propriété qu'elle a de saccharifier facilement la dextrine.

Dans la fermentation, cette saccharification est accompagnée de la destruction des produits formés, et du renouvellement incessant de la cause agissante: aussi la saccharification est-elle complète. Il est en effet démontré par les expériences de MM. Duclaux¹, Lindet² et Dubourg³ que l'action d'une diastase

1. DUCLAUX, *Microbiologie*, p. 165.

2. Observations sur la saccharification par la diastase (C. R., mars 1889).

3. DUBOURG. Recherches sur l'amylase de l'urine (*Thèse*, 1889).

est gênée par la présence des produits de dédoublement qu'elle engendre.

De là les différences que nous constatons entre l'action de la diastase du *B. orthobutylicus* agissant seule, et l'action combinée de cette même diastase et du ferment organisé.

Nous allons maintenant passer en revue les divers résultats que nous ont donnés les matières amylacées, pomme de terre, amidon, dextrine, inuline, etc.

Ce sur quoi je voudrais appeler l'attention, c'est sur le nombre considérable de corps de nature variée que peut faire fermenter le bacille et sur les dissemblances que peuvent présenter, dans ces fermentations, des corps de même formule chimique.

Toutes les fois que je le pourrai, je résumerai l'histoire de chaque fermentation par l'équation qui la représente le mieux. Cette équation donne directement le nombre des molécules d'alcool, d'acide acétique et d'acide butyrique produites par la fermentation. Il est clair, d'après ce que nous avons vu jusqu'ici, que ces nombres sont un peu contingents, et varient suivant la nature et l'âge de la semence, les conditions extérieures de la fermentation, son état plus ou moins avancé, etc. Mais c'est là précisément le fait nouveau de ces études, et en montrant maintenant les variations possibles dans la formule de fermentation de corps du même groupe, je continuerai à prouver qu'il n'y a pas de formule possible.

MATIÈRES AMYLACÉES. — A. *Pommes de terre.*

Origine de la semence.	Pommes de terre.
Age de la semence.	2 jours.
Durée de la fermentation	15 jours.

100 c. c. de la liqueur fermentée renferment :

	Sans craie.	Avec craie.
Alcool butylique	0,280	0,042
Acide acétique.	0,077	0,092
Acide butyrique.	0,088	0,819
Acide formique.	Traces.	0
Rapport $\frac{a}{b}$	$\frac{4}{3}$	$\frac{1}{6}$

B. *Empois d'amidon.*

Nous avons fait usage de fécule de pomme de terre, qui

nous donnait à l'analyse les chiffres suivants :

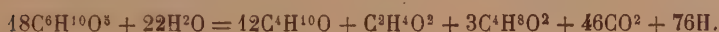
Amidon.	80,12
Eau	15,60
Cendres.	0,34
Substances diverses	3,94
	<hr/> 100,00

Pour préparer l'empois, nous prenions 3 parties de cette fécule pour 100 parties de liquide nutritif¹ et nous stérilisons le tout à 120° pendant 3/4 d'heure. Ce temps est nécessaire si l'on veut avoir une stérilisation complète; sinon, on s'expose à des insuccès.

1° Empois sans craie.

Concentration.	3 ‰, soit 2 ^{gr} ,40 d'amidon vrai.
Origine de la semence.	Pommes de terre.
Age de la semence	4 jours.
Durée de la fermentation	5 mois (juillet-novembre).
Maltose restant ‰.	1,174
Dextrine.	0
Amidon consommé	1 ^{gr} ,29 environ, soit 53,7 ‰.

Formule approchée :



2° Empois avec craie.

Concentration	3 ‰, soit 2 ^{gr} ,40 d'amidon vrai.
Origine de la semence.	Pommes de terre.
Age de la semence.	4 jours.
Durée de la fermentation.	5 mois.
Maltose restant ‰.	0
Dextrine	0
Amidon consommé	2 ^{gr} ,40, soit 100 ‰.

Formule approchée :



C. Dextrine.

Concentration de la solution	4,180 ‰
Origine de la semence	Dextrine.
Age de la semence.	5 jours.
Durée de la fermentation	35 jours.

1° Dextrine sans craie.

100 c. c. de la solution renferment après fermentation :

¹. Voir page 357.

Maltose. . .	2,800 correspondant à dextrine transformée :	2,631
Dextrine. . .	0,864	0,864
Total		3,515
Dextrine consommée	0,665, soit 18,7 %	

Formule approchée :

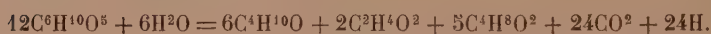


2° Dextrine avec craie.

100 c. c. de la solution fermentée renferment :

Maltose. . .	2 ^{gr} correspondant à dextrine . . .	1 ^{gr} ,89
Dextrine . .	0	
Dextrine consommée	2 ^{gr} ,30, soit 55 %	

Formule approchée :



D. Inuline.

L'inuline dont nous nous sommes servis donnait à l'analyse les chiffres suivants :

Eau.	10,88
Cendres	0,94
Inuline par différence	88,18
Total	100,00

2 grammes de cette substance en solution dans 100 c. c. donnaient à 15° une déviation de $\alpha = -1^{\circ},40$. Ce qui, en tenant compte de l'eau et des cendres, conduit à $[\alpha]_D = -39^{\circ},7$, en considérant l'inuline comme anhydre; et à la formule $[\alpha]_D = -36^{\circ},1$ pour $\text{C}^6\text{H}^{10}\text{O}^5 + \text{H}^2\text{O}$.

Elle ne donnait aucune réduction avec la liqueur de Fehling.

Pour doser l'inuline dans nos liqueurs, nous nous sommes contentés d'évaporer la liqueur à 100°, et de défalquer du poids de l'extrait sec le poids des matières solides autres que l'inuline. Nous avons dû employer cette méthode approximative, faute de procédés plus exacts.

Nous ne pouvions songer à saccharifier l'inuline à 100°, ni encore moins à 120°, au moyen d'un acide minéral, le lévulose formé dans ces conditions s'altérant facilement à la chaleur.

D'ailleurs, comme nous avons toujours opéré de la même manière, nos résultats restent comparables.

La fermentation de l'inuline présente quelques particularités intéressantes que nous allons faire connaître.

L'inuline est consommée par le *Bacillus orthobutylicus* sans subir de transformation préalable. En aucun cas, nous n'avons constaté la présence de sucre réducteur dans nos liqueurs. Ce fait est à rapprocher de ce qui se passe avec la dextrine et l'amidon qui, possédant la même formule que l'inuline, sont toujours dédoublés en maltose par le ferment. La diastase de notre bacille n'a donc aucune action sur cette substance.

Nous avons déjà dit, dans la deuxième partie de ce travail, que l'inuline,ensemencée avec une semence ayant vécu dans le même milieu, donnait peu d'alcool, quelle que soit la réaction du milieu.

Voici les chiffres que nous avons obtenus :

Fermentation d'inuline.

Concentration de la solution.	2 ^{gr} % inuline vraie.
Origine de la semence	Inuline.
Age de la semence	1 jour.
Durée de la fermentation.	38 jours.

1° Inuline sans craie.

Inuline consommée 0,650, soit 32,5 %.

Formule approchée :



Inuline avec craie.

Inuline consommée 4^{gr},33, soit 66,5 %.

Formule approchée :

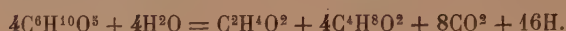


La production de l'alcool, déjà très faible dans les exemples précédents, peut être réduite à zéro quand on emploie une semence âgée. Cette influence de l'âge de la semence a été démontrée abondamment dans la deuxième partie. (Voir page 374.) Le fait suivant vient encore confirmer la règle.

Une fermentation d'inuline de faible concentration (0,76 0/0), ensemencée avec une semence âgée de 20 jours et provenant de pommes de terre, est examinée 42 jours après. La solution est additionnée de carbonate de chaux.

Toute l'inuline a disparu. On ne peut constater que des traces indosables d'alcool.

Formule approchée :



FERMENTATIONS DES SUCRES DE FORMULE $C^6H^{12}O^6$. — A. *Glucose et sucre inverti*. — Dans la deuxième partie de ce travail nous avons déterminé les circonstances qui faisaient varier les formules de fermentation du glucose et du sucre inverti. Les détails dans lesquels nous sommes entrés nous dispensent de donner de nouveaux exemples de fermentation. Nous n'ajouterons que quelques mots sur certaines particularités que présente la fermentation du sucre inverti, et, entre autres choses, sur l'inégalité de consommation des sucres qui le composent.

Une solution de sucre inverti, en contenant 4^{er},83 0/0, est examinée au bout de 2 mois de fermentation.

On trouve à l'analyse qu'elle ne contient plus que du lévulose, en poids de 1^{er},93. Le poids de sucre consommé est de 2^{er},90.

En d'autres termes, pour 200 parties de sucre inverti formées de 100 parties de glucose et de 100 parties de lévulose, on a :

	Avant la fermentation. Après.	
Glucose	100	0
Lévulose.	100	80

Le lévulose offre donc au *B. orthobutylicus* une résistance plus grande que le glucose.

Nous citerons encore une expérience dans laquelle nous avons fait fermenter un mélange de saccharose et de sucre inverti. Ici encore, les sucres sont consommés en quantités inégales, et la quantité pour cent de sucre détruit varie avec la réaction du milieu. Une solution se composant de :

Saccharose.	1 ^{er} ,380 %
Sucre interverti.	2 ^{es} ,032

est répartie dans deux ballons dont l'un est additionné de craie.
La fermentation est examinée 46 jours après.

	Sucres existant avant la fermentation.	Sucres consommés après fermentation.	Pour 100.
<i>Sans craie.</i>			
Saccharose	1 ^{er} ,380	0,100	7,2
Glucose	1 ^{er} ,016	0,286	28,1
Lévéulose	1 ^{er} ,016	0,056	5,5
<i>Avec craie.</i>			
Saccharose	1 ^{er} ,380	0,755	54,7
Glucose	1 ^{er} ,016	0,912	89,7
Lévéulose	1 ^{er} ,016	0,762	75,0

B. *Galactose*. — Le galactose dont je me suis servi avait été préparé par interversion du lactose et purifié par plusieurs cristallisations dans l'alcool à 80°. Il avait son pouvoir rotatoire normal.

Nous ne donnerons qu'une seule fermentation de galactose, additionné de craie. Les produits s'y rencontrent dans les mêmes proportions qu'avec le glucose.

Concentration de la solution.	3 %
Origine de la semence	Galactose.
Age de la semence	2 jours.
Durée de la fermentation	5 mois.
Quantité de galactose consommé.	2 ^{es} ,46 = 82 %

Formule approchée :



FERMENTATIONS DES SUCRES DE FORMULE $C^5H^{10}O^5$. — *Arabinose*. — L'arabinose sur laquelle j'ai opéré avait été préparée par saccharification de la gomme de cerisier, à l'autoclave à 120°, avec 2 0/0 d'acide sulfurique. Après une cristallisation dans l'alcool, j'ai examiné son pouvoir rotatoire, que j'ai trouvé égal à $(\alpha)_D = +98^\circ$. Ce nombre étant plus faible que celui donné par Kiliani¹ (+105°,1), j'ai tenu à vérifier l'identité de mon sucre par les caractères suivants.

1. KILIANI, *Deutsch. chem. Gesellsch.*, t. XIX, p. 30, 29.

5 grammes de sucre traités par 20 c. c. d'acide azotique et évaporés au tiers : pas d'acide mycique.

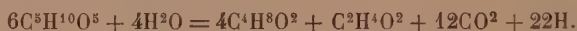
Avec l'oricine et l'acide chlorhydrique : coloration violet bleu¹.

C'était donc bien de l'arabinose.

Arabinose avec craie.

Concentration de la solution	3 ^{gr} ,12 %
Origine de la semence	Arabinose.
Age de la semence	4 jours.
Durée de la fermentation	3 mois.
Quantité d'arabinose consommée	2,18 soit 70 %.

Si l'on néglige la petite quantité d'alcool produit, la formule la plus simple est la suivante :



En tenant compte de l'alcool, il faut :



Malgré sa formule en C^5 , l'arabinose se conduit donc vis-à-vis du *Bacillus orthobutylicus* comme un glucose ordinaire, sauf pour l'alcool, qui est produit en quantité beaucoup plus faible.

FERMENTATIONS DES SUCRES DE FORMULE $C^{12}H^{22}O^{11}$. — A. *Saccharose*. — On a longtemps admis que nul être organisé ne pouvait assimiler le sucre de canne qu'après l'avoir interverti. Depuis quelques années, divers expérimentateurs ont rencontré des bactéries qui faisaient exception à cette règle. Je signalerai, entre autres, la levure de M. Roux, le bacille amylozyme de M. Perdrrix, et divers ferments lactiques².

Le *Bacillus orthobutylicus* offre un nouvel exemple d'assimilation directe du sucre de canne. Dans aucune de nos fermentations de saccharose nous n'avons pu constater de réduction sensible, et la rotation de la liqueur a toujours été dextrogyre.

La recherche de la sucrase nous a naturellement donné un résultat négatif.

Mais, comme on pouvait supposer que la transformation du

1. BERTRAND, Sur quelques réactions colorées des hydrates de carbone. (*B. Soc. chim.*, VI, 259.)

2. BOURQUELOT, Sur le non-dédoublément préalable du saccharose et du maltose dans leur fermentation lactique. (*Journal de Pharmacie et de Chimie* (5), VIII, 1883, 420.)

sucré se faisait à l'intérieur des cellules du bacille, nous avons filtré une fermentation de sucre de canne, du volume de plusieurs litres, de manière à recueillir le ferment. Celui-ci, lavé rapidement à l'eau distillée, fut broyé au mortier avec de la nouvelle eau et mis à digérer dans ce liquide à 35°, pendant plusieurs jours, en présence d'essence de moutarde. Dans ces conditions, nous pouvions espérer que si le bacille renfermait quelque diastase inversive, celle-ci se diffuserait dans le liquide ambiant.

Il n'en a rien été. La liqueur filtrée, toujours additionnée d'essence de moutarde et ajoutée à une solution de saccharose, a été sans action sur elle, même après un temps très long.

La transformation du saccharose à l'intérieur des cellules du bacille est donc peu probable.

Le saccharose non additionné de craie fermente difficilement. Dans l'exemple que nous donnons plus loin, il n'y a seulement que 15 0/0 du sucre employé de détruit après 2 mois.

Fermentation de saccharose.

Concentration de la solution.	3gr,08 %.
Origine de la semence	Saccharose.
Age de la semence	1 jour.
Durée de la fermentation.	2 mois.

a. Sans craie.

Saccharose consommé	0,469, soit 15,1 %.
-------------------------------	---------------------

1 gramme de saccharose détruit donne :

Alcool butylique	0,228
Acide acétique	0,076
Acide butyrique	0,392
Rapport $\frac{a}{b}$	$\frac{2}{7}$

Il n'est pas possible de traduire ces résultats par une formule unique. C'est ce qui arrive d'ordinaire pour le tout premier début d'une fermentation active, et pour les fermentations qui s'arrêtent lorsqu'il n'y a qu'une très faible proportion de la matière fermentescible détruite.

La petite quantité de substance consommée est ici une preuve de la difficulté qu'éprouve le bacille à attaquer le sucre de canne dans un milieu qui devient promptement acide. De là des irrégularités dans la marche de la fermentation, qui se traduisent par l'impossibilité de trouver une formule simple du phénomène.

b. Avec craie.

Saccharose consommé 2^{gr},57 = 83,4 %.

Formule approchée :



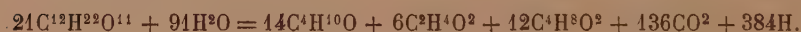
Ici la marche de la fermentation est régulière et la formule se simplifie.

Nous donnerons encore les résultats d'une fermentation dans laquelle la consommation du sucre a été totale, mais dont la durée s'est élevée à 4 mois; cette augmentation dans la durée a eu pour effet d'abaisser le taux de l'acide butyrique; c'est là une confirmation de la règle que nous avons donnée plus haut.

Fermentation de saccharose avec craie.

Concentration de la solution	3,45 %.
Origine de la semence	Saccharose.
Age de la semence	1 jour.
Durée de la fermentation	4 mois.
Saccharose consommé	3 ^{gr} ,45, soit 100 %.

Formule approchée :



B. Maltose.

L'étude de la fermentation du maltose se confond avec celle de l'amidon et de la dextrine, puisque ces substances sont transformées intégralement en maltose par le *B. orthobutylicus*. Nous savons aussi que le maltose n'est pas interverti, puisque nous n'avons jamais rencontré de glucose dans les liqueurs. D'ailleurs, dans une expérience où nous avons fait agir directement le bacille sur le maltose, nous n'avons pas constaté davantage d'inversion.

De même que le saccharose, le maltose ne subit pas l'inversion et est consommé en nature.

C. Lactose.

Le lactose, comme les autres saccharoses, n'est pas dédoublé par le *Bacillus orthobutylicus*.

Fermentation de lactose additionné de craie.

Concentration de la solution	3,56 %.
Origine de la semence	Lactose.

Age de la semence	4 jours.
Durée de la fermentation	3 mois.
Lactose consommé	28 ^c = 57 0/0.

Formule approchée :



ALCOOLS POLYATOMIQUES. — A. *Mannite*. — La mannite ne possédant pas de pouvoir rotatoire appréciable, et ne réduisant pas la liqueur cupropotassique, nous avons dû, pour la doser, opérer comme pour l'inuline, c'est-à-dire défalquer du poids de l'extrait sec toutes les substances autres que la mannite et déduire le poids de celle-ci par différence.

La fermentation de la mannite est lente.

Dans l'exemple que nous donnons, une solution à 3 0/0 environ renfermait encore 52 0/0 de mannite après 46 jours de fermentation en présence de craie.

Une analyse de gaz faite dans les mêmes conditions que celle de la page 25, c'est-à-dire à l'aide de la trompe de Schloësing, nous montre que la quantité d'alcool formé va constamment en augmentant, comme dans la fermentation du glucose.

En effet : 20 c. c. de solution de mannite à 2,23 0/0 sontensemencés et mis immédiatement à l'étuve à 35°.

Durée.	Volume total à 0° et 760mm.	CO ²	H	Rapport $\frac{H}{CO^2}$ en volume.
—	—	—	—	—
1 jour. . .	47 ^{cc} ,42	6,10	11,32	$\frac{64,9}{35,4}$
8 jours . .	20 ^{cc} ,84	12,06	8,78	$\frac{42,1}{57,9}$
15 jours . .	36 ^{cc} ,43	21,42	45,01	$\frac{41,5}{58,5}$
20 jours . .	5 ^{cc} ,72	3,42	2,30	$\frac{40,2}{59,8}$
Total . .	80 ^{cc} ,41	42,70	37,41	$\frac{46,6}{53,4}$

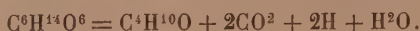
Si nous tenons ici le même raisonnement que pour le glucose, nous voyons qu'en supposant la mannite fermentant sans donner d'alcool, on aurait :



Rapport en volume :

$$\frac{H}{CO^2} = \frac{60}{40}.$$

Si au contraire on n'avait que de l'alcool dans la réaction, celle-ci deviendrait :



Rapport :

$$\frac{H}{CO^2} = \frac{40}{60}.$$

Ce sont précisément les rapports que nous obtenons au commencement et à la fin de la fermentation.

Fermentation de mannite avec craie.

Concentration de la solution	38,39 %.
Origine de la semence	Mannite.
Age de la semence	4 jours.
Durée de la fermentation	46 jours.
Mannite consommée	18,64 = 48 %.

Formule approchée :



B. Glycérine.

La glycérine se trouvant mélangée dans nos fermentations à de l'alcool butylique et à des acides volatils, ou à leurs sels de chaux, son dosage présentait certaines difficultés, d'autant plus qu'une méthode précise d'analyse de cette substance reste encore à trouver.

J'ai fait usage de la méthode suivante due à M. Pasteur.

Un volume déterminé de liquide, neutralisé exactement par de l'eau de chaux, était évaporé lentement au bain-marie d'abord, et finalement dans le vide sec. Le résultat était repris par un mélange d'alcool et d'éther. L'éther étant distillé dans un petit ballon, on dissolvait la glycérine dans un peu d'eau qu'on évaporait ensuite lentement au bain-marie, dans une petite capsule de platine, en faisant une pesée tous les quarts d'heure. Dès que la perte de poids entre deux pesées n'était plus que de quelques milligrammes et devenait constante, on pouvait considérer celle-ci comme étant due à l'évaporation de la glycérine. On

adoptait donc, comme poids, la pesée à partir de laquelle la perte de poids devenait constante.

Nous n'avons pu constater, dans le cours de nos fermentations, la formation d'aucun corps réducteur, mais, en suivant exactement la méthode générale que nous avons décrite dans la première partie (voir page 361), nous avons rencontré, en très faible quantité, il est vrai, de l'acide lactique *gauche*, caractérisé par son sel de zinc. Aucune des fermentations que nous avons examinées, autres que la glycérine, ne nous a donné ce corps. Plusieurs essais différents, faits dans des conditions de pureté absolue, nous ont donné le même résultat; il ne s'agit donc pas là d'un accident d'expérience, ni d'une association microbienne. D'ailleurs, la quantité d'acide lactique formé est très faible et nous avons dû la négliger dans l'équation de la fermentation.

Fermentation de glycérine.

Concentration de la solution.	28 ^r ,53 %.
Origine de la semence	Pommes de terre.
Age de la semence.	1 jour.
Durée de la fermentation.	52 jours.

A. Glycérine sans craie.

Quantité de glycérine consommée 0,73 = 29,2 %.

1 gramme de glycérine donne :

Alcool butylique	0,643
Acide acétique.	0,026
Acide butyrique	0,153
Rapport $\frac{a}{b}$	$\frac{1}{4}$
Acide lactique gauche.	Traces.

Il n'est pas possible d'établir une équation unique.

B. Glycérine avec craie.

Glycérine consommée. 48^r,89 = 74,9 %.

1 gramme de glycérine donne :

		Calculé.
Alcool butylique.	0,075	0,080
Acide acétique.	0,025	0,026
Acide butyrique.	0,228	0,229
Acide lactique.	Traces.	
Rapport $\frac{a}{b}$	$\frac{1}{6}$	

Formule approchée :



RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Dans la première partie de ce travail, j'ai décrit un bacille anaérobie nouveau que j'ai isolé et auquel j'ai donné le nom de *Bacillus orthobutylicus*.

J'ai établi sa morphologie, ses fonctions physiologiques et ses caractères distinctifs.

J'ai indiqué les méthodes employées pour le cultiver à l'état de pureté, et déterminé la nature des produits qu'il donne avec les différents milieux. Ces corps sont : l'alcool butylique *normal*, l'acide acétique, l'acide butyrique normal, et comme gaz : l'acide carbonique et l'hydrogène.

J'ai décrit les méthodes employées pour doser ces différentes substances dans les fermentations.

Dans la deuxième partie, j'ai étudié :

1° *L'Influence de la durée de la fermentation.*

J'ai montré :

1° Que le rapport entre la substance fermentescible consommée et les produits qui résultent de sa destruction, n'est jamais constant pendant le cours d'une fermentation ;

2° Que la quantité d'alcool butylique va en augmentant tandis que le poids des acides butyrique et acétique va en diminuant ;

3° Que le rapport $\frac{a}{b}$ va en diminuant en milieu neutre et en augmentant en milieu acide ;

4° Que la formule de l'équation est d'autant plus simple qu'il y a plus de matière consommée ;

5° Que la fermentation est d'autant plus régulière que la concentration de la solution est plus faible ;

6° Que l'acide formique n'apparaît que comme produit de souffrance, et qu'il peut être consommé dans le cours d'une fermentation.

2° *L'Influence de l'âge de la semence.*

J'ai démontré :

1° Que l'âge d'une semence a une influence considérable sur la marche d'une fermentation ;

2° Qu'au point de vue de la production de l'alcool butylique,

l'activité d'une semence croît pendant les premiers jours, pour décroître ensuite, au fur et à mesure de la formation des spores;

3° Que la production d'acide butyrique suit une marche inverse;

4° Qu'une semence vieillit d'autant plus rapidement que le milieu où on la cultive est plus fermentescible.

5° *L'Influence de l'éducation de la semence.*

J'ai démontré :

1° Que la nature du milieu sur lequel on cultive une semence communique à celle-ci des propriétés spéciales;

2° Que si on cultive le *B. orthobutylicus* sur de l'inuline, milieu dans lequel il ne donne que des traces d'alcool, et qu'on le reporte sur glucose, il donnera dans ce milieu une quantité d'alcool trois fois supérieure à la normale;

3° Qu'inversement, cultivé sur glucose, il acquiert la propriété de faire avec de l'inuline de l'alcool en notable proportion.

Ces faits sont comparables à ce qui se passe avec les microbes pathogènes.

4° *L'Influence de la réaction du milieu.*

J'ai fait voir :

1° Que lorsque le milieu s'acidifie, la proportion d'alcool formé augmente en même temps que l'acide diminue;

2° Qu'inversement l'alcool diminue et l'acide augmente quand le milieu est maintenu neutre par addition de carbonate de chaux.

Dans la troisième partie, j'ai passé en revue l'action du *Bacillus orthobutylicus* sur les divers milieux où on peut le cultiver; ces milieux sont :

Les matières amylacées (pommes de terre et empois d'amidon), la dextrine et l'inuline, le glucose et le sucre interverti, le galactose, l'arabinose, le saccharose, le maltose et le lactose, la mannite et la glycérine.

J'ai établi pour chacune de ces substances l'équation de sa fermentation.

J'ai signalé en outre les particularités suivantes :

1° La bacille sécrète une diastase qui transforme la dextrine en maltose; par suite, dans la fermentation des matières amylacées, on ne trouve que du maltose sans dextrines;

2° Les substances lévogyres, telles que le lévulose et l'inuline, présentent certaine résistance à son action ;

3° Il fait fermenter les saccharoses sans les intervertir ;

4° Il donne toujours, avec la glycérine, de petites quantités d'acide lactique gauche ;

5° L'équation de la fermentation varie avec la nature de la substance fermentescible.

En résumé, la fermentation étant le résultat d'un acte vital doit être influencée par les variations multiples auxquelles sont soumis les êtres vivants.

Chaque cellule du ferment, soumise aux lois immuables de la vie, passe par un maximum d'activité, puis vieillit et meurt ; si l'on réfléchit que dans le courant d'une fermentation on rencontre à la fois des cellules qui viennent de naître et des cellules en voie de dégénérescence ; si l'on ajoute que les produits qui prennent naissance peuvent, à leur tour, entraver l'action de ces cellules, on comprendra combien est illusoire l'idée de vouloir représenter le phénomène par une formule unique et simple !

RECHERCHES SUR LE CHOLÉRA ET LES VIBRIONS

PAR EL. METCHNIKOFF

PREMIER MÉMOIRE

Sur la propriété préventive du sang humain vis-à-vis du vibrion de Koch.

I

APERÇU DES ACQUISITIONS NOUVELLES SUR LE CHOLÉRA

Malgré la découverte d'un vibrion particulier dans l'intestin de la grande majorité des cholériques, la microbie du choléra reste encore bien obscure sous beaucoup de rapports. Cela tient surtout à cette circonstance que le choléra est une maladie spécifique de l'homme. Les animaux sur lesquels on peut expérimenter sont réfractaires à cette maladie.

Comme nous tenons, avant d'entrer dans le sujet particulier de notre étude, à donner au lecteur, qui n'a pas présents à l'esprit les détails de publications déjà très nombreuses, un aperçu sommaire de l'état actuel des connaissances microbiennes sur le choléra, nous l'entretiendrons d'abord de l'étiologie de cette maladie; nous passerons ensuite aux résultats de l'expérimentation sur la maladie des animaux, provoquée par le *bacille virgule*.

D'après les recherches de Koch et de ses élèves, *le choléra est un état particulier de l'homme dans lequel l'intestin renferme des vibrions cultivables sur la gélatine nutritive à 10 % et produisant une liquéfaction moyenne*. A l'époque de la découverte de Koch, on admettait que ces vibrions se trouvaient dans tous les cas de *choléra épidémique*, bien caractérisé au point de vue clinique. Mais pendant la dernière épidémie on a constaté que certains malades, qui présentaient tous les symptômes classiques du choléra asiatique, peuvent ne pas avoir dans leur intestin de bacilles virgules (vibrions de Koch). Ces cas ont été regardés

comme des cas de *choléra nostras*. Poursuivant ces études, on a constaté que le vrai choléra asiatique était toujours accompagné d'épidémies de choléra nostras. Et, ce qui est remarquable, c'est que ce choléra nostras, sans bacilles virgules, apparaît même en hiver. Ainsi M. Rumpel¹ en a observé trois cas survenus à Hambourg pendant les froids rigoureux de cet hiver, lors d'une petite épidémie de vrai choléra.

D'un autre côté, on insistait autrefois sur ce fait que le bacille virgule ne se trouve que chez des individus atteints de choléra léger ou grave. A présent on a abandonné cette opinion, car on a constaté ce microbe dans les selles normales d'individus bien portants, mais se trouvant dans des milieux atteints par l'épidémie cholérique (Rumpel, *l. c.*). Les partisans de la théorie de Koch ont reconnu que le bacille virgule peut se cultiver dans l'intestin de l'homme sans provoquer nécessairement le choléra.

En dehors de la présence constante et exclusive du vibron de Koch chez les cholériques, on a invoqué encore, comme argument principal du rôle étiologique de ce microbe, qu'il est absolument différent des autres bactéries. Lors des recherches faites en 1883 et 1884, on pouvait penser, en effet, que le bacille virgule représentait une espèce tout à fait particulière et toujours nettement distincte. Mais depuis on a découvert toute une série de vibrions très semblables, notamment ceux de Deneke et de Gamaleïa. Pour les distinguer du vibron de Koch, il a fallu recourir à des caractères de faible importance : degré de liquéfaction de la gélatine, détails de forme, etc. Pour maintenir la spécificité du vibron de Koch, on a dû se placer sur le terrain d'un monomorphisme étroit. Les recherches multipliées sur le choléra, faites dans différentes parties du globe, ont ébranlé la doctrine de l'uniformité du vibron cholérique. Les premières affirmations de M. Cunningham² sur la pluralité des espèces vibrioniennes chez les cholériques ont été accueillies avec scepticisme, cette pluralité ne se conciliant pas bien avec l'uniformité du vrai choléra. Mais M. Max Gruber, qui d'abord³ s'est prononcé contre la multiplicité des vibrions cholériques, a dû bientôt modifier son opinion dans un sens contraire. Dans son travail publié

1. *Deutsche medicin. Woch.*, 1893, p. 460.

2. *Archiv für Hygiene*, 1892, t. XIV, p. 48.

3. *Transactions of the VII Intern. Congress of Hygiene*, vol. II, 1892, p. 41.

avec M. Wiener¹, il reconnaît la possibilité de séparer le vibron cholérique en plusieurs espèces voisines. M. Selavo² admet aussi que le vibron de Massaua, isolé par M. Pasquale, appartient à une espèce différente du type original découvert dans l'Inde. Mais les élèves de M. Kock (R. Pfeiffer, Wassermann, Gaffky, etc.) maintiennent l'identité spécifique de tous les vibrions cholériques, ce qui n'est possible qu'en admettant un pléomorphisme très large.

Les faits recueillis dans ces derniers temps compliquent donc la question de l'étiologie du choléra, qui sans cela présentait déjà bien assez de points difficiles et obscurs.

Comme le choléra est une maladie essentiellement humaine, seule l'expérimentation sur l'homme pourrait résoudre le problème. Plusieurs savants se sont prêtés à l'expérience et ont absorbé des cultures pures du vibron de Koch. Mais, malgré toutes les précautions employées pour faire agir le virus, celui-ci n'a amené qu'une diarrhée non accompagnée du cortège classique des symptômes du choléra. Ni l'alcalinisation du suc gastrique, ni les écarts volontaires de régime, ni la prédisposition à la diarrhée, n'ont permis au vibron de Koch de produire le vrai choléra. Il est vrai que M. Gaffky³, qui a fourni le virus à MM. Pettenkofer et Emmerich, a déclaré que la culture provenait d'un cas de choléra bénin. Mais cette objection ne s'applique pas à MM. Hasterlik et à ses collaborateurs, car ceux-ci ont absorbé dans quatre expériences un virus qui provenait d'un cas mortel de choléra⁴. Lorsque les vibrions ont été avalés sans alcalinisation préalable du suc gastrique, l'effet a été presque nul; dans un cas seul où l'ingestion du virus fut précédée de celle de bicarbonate de soude, les expérimentateurs ont eu de la diarrhée simple. A ces six essais négatifs (Pettenkofer, Emmerich, Hasterlik et trois de ses collaborateurs) il faut ajouter encore un nombre plus grand d'expériences, relatées par M. Ferran. D'après cet observateur⁵, beaucoup de personnes qui n'avaient pas subi préalablement des

1. *Archiv für Hygiene*, 1892, t. XIV, p. 254.

2. *Rivista d'Igiene et Sanità pubblica*, 1892, n° 19.

3. *Semaine médicale*, 1893, p. 174.

4. *Wiener klin. Wochenschr.*, 1893, p. 167.

5. *Revendication de la priorité de la découverte des vaccins du choléra*. Barcelone, 1888, p. 93.

injections hypodermiques de bacille virgule, n'eurent qu'une « cholérine qui guérit spontanément », après l'absorption de 5 ou 6 gouttes de cultures capables de tuer le cobaye en injection sous-cutanée. D'autres personnes, « vaccinées » préalablement, comme M. Ferran lui-même et son assistant, M. Pauli¹, ont eu également une diarrhée légère après l'absorption de quelques gouttes de culture, sans alcalinisation préalable de l'acidité gastrique.

Dans un assez grand nombre d'expériences sur l'homme, l'effet du vibrion de Koch a donc été ou nul ou insignifiant, si on le compare avec la gravité du vrai choléra asiatique. Quelle différence sous ce rapport avec un autre spirille, celui de la fièvre récurrente, qui, inoculé à plusieurs personnes, leur donna toujours la maladie typique et complète !

De quelque côté que nous envisagions l'étiologie du choléra, nous voyons que le problème reste très compliqué et que beaucoup de travail est encore nécessaire pour l'éclaircir. Il est donc tout naturel qu'un grand nombre de bactériologistes se soient mis à étudier l'histoire naturelle des vibrions, leur action pathogène sur les animaux, et ceux de leurs produits capables de conférer l'immunité.

Tout le monde aujourd'hui accepte que la maladie expérimentale provoquée par le vibrion de Koch, chez des animaux de laboratoire, notamment les cobayes, diffère essentiellement du choléra humain. Mais les uns considèrent cette maladie comme une vraie infection, tandis que pour d'autres elle est une intoxication. La divergence de vues qui s'est produite sous ce rapport entre M. R. Pfeiffer et M. Gruber est prête à s'aplanir. Déjà M. Haffkine, en augmentant la virulence du vibrion cholérique par passages de cobaye à cobaye, avait fourni un argument à la théorie de l'infection. Dans sa dernière publication, faite en commun avec M. Wassermann, M. Pfeiffer² reconnaît que la maladie, provoquée chez le cobaye par injection péritonéale du bacille virgule, doit être considérée comme un processus mixte d'infection et d'intoxication. Mais il est évident aussi que, d'après les données si intéressantes fournies

1. *L'Inoculation préventive contre le choléra morbus*. Paris, 1893, p. 90-92.

2. *Zeitschr. f. Hygiene*, 1893, t. XIV, p. 59.

par ces deux savants, il faut se ranger complètement à l'avis de M. Gruber, c'est-à-dire envisager la maladie du cobaye comme une vraie et simple infection. D'abord il ne faut pas oublier que dans chaque maladie infectieuse les toxines microbiennes jouent toujours un grand rôle. Mais surtout il faut tenir compte du fait, constaté par MM. Pfeiffer et Wassermann, que les cobayes vaccinés contre le virus vivant sont tout aussi sensibles que les témoins vis-à-vis de la dose mortelle de toxine vibrionienne. Si les cobayes vaccinés ne sont pas immunisés contre l'intoxication, il est évident que la maladie, contre laquelle ils ont été rendus réfractaires, est une infection.

Poursuivant leurs études sur l'essence de cette immunité acquise par les cobayes, MM. Pfeiffer et Wassermann ont constaté plusieurs faits du plus haut intérêt. Je me permets de les mentionner dans cet aperçu parce qu'ils touchent de très près au problème général de l'immunité. Ces observateurs se sont assurés de ce fait, à savoir : *que la propriété préventive du sérum ne réside nullement dans un pouvoir antitoxique*, comme cela a été affirmé, surtout en Allemagne. Sous ce rapport, MM. Pfeiffer et Wassermann confirment les données qui ont été pour la première fois démontrées dans mon mémoire sur la pneumo-entérite des porcs ¹. Plus tard le même fait a été constaté dans mon laboratoire par M. Sanarelli ² pour le vibrion de Gamaleïa (V. Metchnikowii), bactérie très voisine du bacille virgule de Koch. Pour ce qui concerne le vibrion de Massaua, je peux confirmer l'affirmation de MM. Pfeiffer et Wassermann, en me basant sur des recherches personnelles faites sur les toxines chauffées à différentes températures, ou puisées dans des cultures vieilles et devenues stériles.

Même pour une maladie qui a un caractère toxique aussi prononcé que le « choléra » des cobayes, il reste vrai que l'immunité et la propriété préventive ne reposent nullement sur un pouvoir antitoxique quelconque. MM. Pfeiffer et Wassermann voient bien maintenant que cette immunité doit être attribuée à une propriété bactéricide de l'organisme. Pour M. Pfeiffer, qui depuis longtemps s'est prononcé en faveur de la théorie du pou-

1. *Annales de l'Inst. Past.*, 1892, p. 296.

2. *Ibid.*, 1893, p. 236.

voir bactéricide des humeurs, il était tout naturel de supposer que celui-ci se manifeste dans la maladie provoquée par le vibron de Koch. Aussi, dans son premier mémoire sur le choléra, M. Pfeiffer a envisagé les phénomènes exclusivement au point de vue de la propriété bactéricide du plasma sanguin et du liquide des exsudats. Voilà pourquoi je dois noter avec une grande satisfaction la modification des idées de M. Pfeiffer. Dans son dernier travail exécuté avec M. Wassermann, il constate le peu d'importance de la propriété bactéricide des humeurs. Ainsi le sérum sanguin d'un convalescent du choléra était doué d'une propriété préventive très considérable et ne présentait cependant qu'un pouvoir bactéricide trop insignifiant pour expliquer l'immunité. Sous ce rapport, MM. Pfeiffer et Wassermann, eux aussi, arrivent à la même conclusion que M. Sanarelli dans son travail sur le vibron de Gamaleïa. Je puis confirmer ce résultat pour les vibrions du choléra.

Les deux auteurs allemands, dans leur étude sur l'essence de l'immunité, n'ont pas fait de recherches spéciales sur la propriété atténuante des humeurs, considérant probablement qu'elle ne joue aucun rôle dans ce cas. En réalité, les expériences que j'ai entreprises sur ce point ont démontré que, dans le « choléra » des cobayes, les choses se passent tout à fait comme dans la maladie provoquée par le vibron de Gamaleïa, d'après les recherches de M. Sanarelli, c'est-à-dire que l'atténuation ne se produit pas. La prétendue atténuation n'est que l'effet de la propriété préventive du sérum ¹.

Après avoir mis en évidence que les propriétés humorales

1. Ce résultat est déjà acquis pour plusieurs (au moins quatre) infections : il peut donc être considéré comme quelque chose de général. Ces faits bien établis répondent aux critiques de M. Charrin. Dans un travail intitulé : *Les antitoxines et l'immunité* (*Semaine médicale*, 1893, p. 85), ce savant cherche à prouver l'action atténuante du sérum des lapins vaccinés sur le bacille pyocyanique. Mais ce microbe convient beaucoup moins pour ce genre de recherches que les bactéries du hog-choléra, du choléra des cobayes, de la septicémie vibrionienne et de la pneumonie. C'est pour cela que je n'analyserai pas dans tous leurs détails les expériences faites avec le bacille pyocyanique, et que je ne discuterai pas les points généraux, visés dans l'article mentionné. M. Charrin « avoue ne pas comprendre clairement » (p. 86) comment il peut se faire qu'un virus renforcé dans l'organisme vacciné arrive à être détruit par ce dernier au lieu de le tuer lui-même. C'est cependant très simple. Les phagocytes de l'organisme vacciné se sont à tel point accoutumés aux sécrétions toxiques que celles-ci, malgré le renforcement, n'empêchent point l'englobement et la destruction des bactéries.

(antitoxique et bactéricide) n'ont pas d'importance dans l'immunité et la prévention des cobayes contre le vibrion de Koch, MM. Pfeiffer et Wassermann arrivent à ce résultat que, dans ces phénomènes, « les processus phagocytaires jouent un rôle ». « Mais — ajoutent-ils — nous inclinons vers l'opinion que la phagocytose n'est qu'un phénomène secondaire, qui suit la mort des bactéries, mort provoquée par d'autres processus encore problématiques. » (P. 50.) Les adversaires de la théorie des phagocytes, ne pouvant plus invoquer les propriétés bactéricides et antitoxiques des humeurs, se retranchent derrière des propriétés problématiques et insaisissables. Je regarde, pour ma part, cette nouvelle attitude comme un succès pour les idées que je défends. Mais, dans le cas qui nous occupe, il est très facile de constater de la façon la plus exacte le rôle bactéricide des phagocytes. Il n'y a qu'à retirer une goutte de l'exsudat des cobayes réfractaires, qui ne renferme que des vibrions inclus dans les leucocytes, et à le mettre à l'étuve. Dès les premières heures du séjour à 38°, on verra les vibrions se développer dans l'intérieur des leucocytes, et transformer ceux-ci en sacs volumineux remplis d'une masse de vibrions. Bientôt après ces sacs éclatent, et les vibrions dispersés dans le liquide de l'exsudat forment une culture des plus riches. Ces phénomènes, qui se passent exactement comme dans le cas du vibrion de Gamaleïa, montrent jusqu'à l'évidence que les vibrions, dans l'exsudat des cobayes réfractaires, ne sont point tués par un agent problématique, mais bien par une fonction des phagocytes. J'ai pu à plusieurs reprises constater ce fait pour les vibrions du choléra. Il est juste de rappeler que c'est d'abord M. Gruber¹, et ensuite M. Vincenzi², qui ont attiré l'attention sur le rôle des phagocytes dans le « choléra » des cobayes.

Nous pouvons donc insister sur ce résultat général que *l'immunité acquise des cobayes vis-à-vis des vibrions du choléra est un nouvel exemple en faveur de la théorie des phagocytes.*

Bien moins nette est la question de savoir si les cobayés peuvent être sûrement vaccinés contre l'introduction d'une dose mortelle de vibrions dans l'estomac. Dans leur dernier travail,

1. Au Congrès international d'hygiène de Londres, 1891.

2. *Deutsche med. Woch.*, 1892, p. 394; *Archivio per le scienze mediche*, 1892, p. 337.

MM. Pfeiffer et Wassermann affirment, contrairement à l'assertion de MM. Gamaleïa, Hafkine, Brieger, Kitasato et Wassermann¹, que les cobayes vaccinés par n'importe quelle méthode ne deviennent pas pour cela plus résistants que les cobayes non vaccinés à l'action des vibrions introduits dans l'estomac.

Il est facile de comprendre que ces recherches sur l'immunité des animaux vis-à-vis des vibrions présentent non seulement un grand intérêt théorique, mais sont d'une grande importance pour ce qui concerne les questions purement pratiques de la prophylaxie humaine. C'est ce qu'avait déjà senti M. Ferran, qui le premier a démontré la possibilité de vacciner les cobayes contre le vibron de Koch. Les premiers expérimentateurs qui ont contrôlé les recherches du savant espagnol ont mis en doute les résultats qu'il avait annoncés, et jeté la défaveur sur ses travaux : mais à présent il est définitivement prouvé que M. Ferran avait parfaitement raison. On peut facilement vacciner les cobayes contre le bacille virgule, par la méthode Ferran, c'est-à-dire avec des cultures virulentes en faible quantité ou avec des cultures stérilisées.

M. Ferran a appliqué en 1883, sur une grande échelle, les vaccinations anticholériques chez l'homme. Il a inoculé plus de 50,000 personnes. Malheureusement les statistiques qu'il donne² ne permettent point de se prononcer sur la valeur de ses vaccinations. A ces grands nombres, nous préférerions de beaucoup des chiffres plus faibles, mais accompagnés de tous les détails nécessaires pour permettre un jugement fondé. D'après quelques indications, fournies par le nombre des cas de choléra survenus parmi les vaccinés et les non-vaccinés dans les cinq premiers jours après la vaccination, il semble résulter que celle-ci a été souvent pratiquée dans la partie de la population la moins sujette à la maladie (voir notamment les chiffres sur Benifayo, Cheste, Masanasa, p. 262-264 du livre de M. Ferran).

Comme on peut s'en convaincre par la lecture du travail de MM. Pfeiffer et Wassermann, bien des points expérimentaux sont encore obscurs dans cette question des vaccinations préventives. M. G. Klemperer³ a eu l'idée d'appliquer les données four-

1. *Zeitschr. f. Hygiene*, 1892, t. XII, p. 463.

2. *L'inoculation préventive contre le choléra*, 1893.

3. *Berlin. k'in. Wochenschr.*, 1892, p. 789.

nies par l'étude de la propriété préventive du sérum à la solution de quelques-uns des problèmes que soulève la prophylaxie anticholérique. C'est aussi par l'étude de cette propriété préventive que nous voulons commencer l'exposé de nos recherches, nous réservant de publier plus tard nos résultats sur d'autres points touchant le choléra.

II

PROPRIÉTÉ PRÉVENTIVE DU SANG DE L'HOMME NON ATTEINT
DE CHOLÉRA (Appendice I).

M. G. Klemperer¹ a constaté le premier que le sang des personnes qui n'ont pas eu le choléra, peut préserver les cobayes contre l'infection par le bacille virgule. Cette propriété préventive est si fréquente que, sur six individus examinés par M. Klemperer, trois l'ont présentée d'une façon bien nette : 2 c.c. et, dans deux cas même, 1 c. c. de sérum sanguin ont suffi pour préserver les cobayes contre une dose mortelle du vibron cholérique. L'auteur en conclut que les trois personnes qui ont fourni le sérum préventif avaient l'immunité contre le choléra. M. Lazarus² n'a essayé qu'une seule fois le sang de l'homme non atteint de choléra, et il a vu que le sérum de ce sang était préventif à partir de la dose 2 c. c.

Mes propres recherches ont porté sur 12 personnes qui n'ont jamais eu le choléra. Parmi elles se trouvent trois médecins, dont le témoignage présente une importance particulière. La propriété préventive de leur sang a été éprouvée vis-à-vis d'un vibron d'origine indienne qui se rapproche beaucoup du type de Koch, et ne s'en distingue que par l'immobilité dans tous les milieux. Ce microbe tue le cobaye par injection péritonéale ; sa virulence est en général au-dessus de la moyenne.

Le sérum sanguin d'un de ces médecins, injecté à la dose de 1 c. c. dans le péritoine d'un cobaye, ne l'a pas préservé contre une infection mortelle, pratiquée le lendemain. Par contre, 0,75 c.c. de sérum d'un autre médecin et 1,25 c.c. du troisième ont empêché l'infection mortelle des cobayes dans les mêmes conditions expérimentales.

1. *Berlin klin. Wochenschr.*, 1892, p. 970.

2. *Ibid.*, p. 1072.

Le sérum fourni par le sang du cordon d'un nouveau-né, issu d'une jeune femme de 19 ans qui n'avait jamais eu le choléra, injecté à la dose de 1 c. c. dans le péritoine d'un cobaye, ne l'a pas empêché de succomber à l'infection par le vibrion déjà mentionné.

Le plus grand nombre des expériences ont été faites avec du sérum sanguin de jeunes soldats, entrés à l'hôpital du Val-de-Grâce à la suite de différentes maladies autres que le choléra. D'après les renseignements qu'ils ont donnés, ils n'ont jamais eu le choléra. Le sang de cinq de ces jeunes gens n'a point manifesté de propriété préventive, à des doses de 2 et même 2,5 c. c. de sérum. Par contre, trois autres ont fourni un sérum qui était préventif à la dose de 1,5 et même de 1 c. c.

Si à ces 12 cas observés par moi on ajoute les 7 cas de MM. Klemperer et Lazarus, on obtiendra un total de 19 cas, parmi lesquels 9 ont manifesté un pouvoir préventif à des doses de 1 à 2 c. c. On peut en conclure que *la moitié des Européens possèdent dans leur sérum sanguin des substances qui protègent les cobayes contre une infection mortelle*. En portant la dose du sérum au delà de 2,5 c. c. (dose maxima qui ait été employée jusqu'à présent) on pourrait peut-être obtenir encore une plus forte proportion d'hommes possédant cette propriété préventive. Je déduis cette conclusion de ce fait que le sang de la poule présente aussi le même pouvoir préventif vis-à-vis du vibrion indien, mais le plus souvent à partir de 4 c. c. Des doses plus faibles n'exercent cette propriété qu'exceptionnellement.

Faut-il conclure que la moitié des Européens soient naturellement réfractaires contre le choléra? M. Klemperer n'hésite pas à répondre affirmativement. Pour lui, comme pour beaucoup d'autres savants, la propriété préventive du sang est fonction de l'immunité et peut même servir de mesure à cette dernière. Lorsque le pouvoir préventif est manifeste, cela veut dire, d'après la théorie régnante, que l'organisme qui a fourni le sang transmet une partie de son immunité à l'organisme dans lequel ce sang (ou le sérum) est introduit.

Bien que cette théorie soit très répandue, elle est tout aussi peu fondée que cette autre, d'après laquelle la propriété préventive résiderait toujours dans un pouvoir antitoxique. On arrive de plus en plus à envisager cette propriété préventive du sang

comme une action stimulant la résistance de l'organisme. C'est ainsi que j'ai interprété ce phénomène dans mon travail sur le hog-choléra. M. Stern partage le même avis pour la fièvre typhoïde, M. Sanarelli l'a adopté pour le vibron de Gamaleïa, et MM. Pfeiffer et Wassermann viennent d'exprimer la même idée pour le choléra des cobayes. « L'immunisation par le sérum, — disent ces observateurs (*l.c.*, p. 59) — doit être conçue comme une réaction, une modification de l'organisme des cobayes produite par des substances spécifiques, encore inconnues, sous l'influence desquelles l'animal acquiert la propriété de se débarrasser plus rapidement des vibrions. » En d'autres termes, il s'agit ici d'une action stimulante sur l'appareil de la défense, c'est-à-dire en premier lieu sur le système phagocytaire. Dans ces conditions, il est tout naturel que le sang capable d'exciter la réaction dans un organisme étranger, puisse rester inactif dans le corps de l'animal qui l'a fourni. En effet, il a été déjà constaté à plusieurs reprises qu'un organisme sensible peut fournir un sérum préventif. Ce fait a été d'abord observé par M. E. Roux et moi¹ pour ce qui concerne le sang des rats par rapport à la bactériémie. Dans mon mémoire sur le hog-choléra, j'ai également signalé le cas où un lapin vacciné contre cette maladie a fourni un sérum préventif, ce qui ne l'a pas empêché de succomber au microbe du hog-choléra. MM. Roux et Vaillard² ont recueilli un grand nombre de faits, prouvant qu'un animal ou un homme, qui possèdent la propriété antitoxique vis-à-vis de la toxine du tétanos, peuvent mourir de cette maladie. Pour ce qui concerne la maladie des cobayes, provoquée par le bacille virgule, j'ai constaté à plusieurs reprises que les animaux vaccinés qui succombent à la dose minima de la toxine vibrionienne, ou même quelquefois au virus, fournissent des humeurs (sérum sanguin et liquide de l'exsudat) douées d'une propriété préventive très accusée. Je communiquerai les détails de ces expériences dans un de mes prochains mémoires.

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891, p. 479.

2. *Ibid.*, 1893, p. 65.

III

PROPRIÉTÉ PRÉVENTIVE DU SANG DES PERSONNES ATTEINTES
DE CHOLÉRA (Appendice II)

Il n'est pas facile de retirer beaucoup de sang aux personnes atteintes de choléra plus ou moins grave. Aussi je ne me suis décidé à entreprendre ces recherches qu'après m'être assuré que des quantités infimes de sang suffisent déjà pour manifester la propriété préventive. Grâce à l'obligeance de plusieurs médecins, notamment de MM. les docteurs Netter, à Paris, Waquet, à Lorient, et MM. Marandon de Montyel et Fevré à Ville-Evrard, j'ai pu me procurer un certain nombre d'échantillons de sang de cholériques. J'en ai recueilli plusieurs lors de mon séjour à Lorient. Dans la majorité des cas, il fallait se contenter de quelques gouttes de sang qu'on pouvait aspirer dans un tube de verre stérilisé, après avoir fait une piqûre ou une incision au bras ou au doigt. Avec du bouillon stérilisé, on délayait le sang accolé aux parois du tube et on injectait ce mélange dans le péritoine des cobayes.

J'ai expérimenté avec le sang de vingt-deux personnes malades du choléra; parmi elles, quelques unes étaient atteintes légèrement; mais la majorité présentaient une maladie grave. Le lendemain de l'injection du sang dans le péritoine des cobayes, je faisais l'épreuve avec une dose mortelle du vibron indien (mentionné dans le précédent chapitre), injectée dans le même endroit. Des cobayes neufs servaient de témoins et fournissaient la preuve de la virulence du microbe.

Malgré la faible quantité de sang injecté, la propriété préventive a été manifeste dans dix cas sur vingt-deux, c'est-à-dire dans 45 0/0 des malades. Je n'ai pas pu constater un rapport quelconque entre la bénignité de la maladie et l'intensité de la propriété préventive. A côté de cas mortels qui fournissaient cependant un sang préventif, il y en avait d'autres où les malades guérissaient sans que leur sang ait présenté le pouvoir de prévenir la maladie chez les cobayes. Ainsi, dans un cas, à Lorient¹, le sang

1. M^{lle} C., 45 ans, tombe malade le 28 novembre 1892. Elle n'a d'abord que la diarrhée, mais le lendemain se déclare une attaque de choléra grave. Facies cholérique. Vomissements, crampes, selles typiques. Guérison.

retiré le troisième jour de la maladie, n'a pas empêché un cobaye de mourir du vibrion indien; cependant, la malade s'est rétablie. Dans un autre cas¹, observé aussi à Lorient, quelques gouttes de sang, retirées le lendemain du début du choléra, ont préservé un cobaye contre une dose sûrement mortelle du même vibrion; toutefois, le malade est mort en 72 heures. Chez ces deux malades, j'ai pu constater la présence de bacilles virgules dans les déjections.

Parmi les cas de choléra sans propriété préventive du sang, les plus remarquables sont sûrement ceux que j'ai pu observer, grâce à l'obligeance de M. Netter, dans son service au bastion 36, à Paris. Il s'agit de deux malades, atteints d'un choléra grave au commencement de décembre 1892, qui s'est terminé par la guérison. Les bacilles virgules ont été isolés des déjections par M. le Prof. Netter. La saignée a été pratiquée le troisième jour après le début de la maladie. Des quantités de sérum de 0,5 à 1,5 c. c. n'ont pas préservé les cobayes, inoculés avec le vibrion indien. Il est à noter que, dans cette expérience, sur deux cobayes témoins, un a résisté à la même dose du virus que les cobayes traités par le sérum. L'absence de la propriété préventive a été donc bien démontrée dans ces deux cas. Nous reviendrons sur l'un d'eux dans notre chapitre sur le sang des personnes guéries.

Les cas où, malgré un choléra mortel, le sang des malades manifeste une propriété préventive très accusée, ne servent qu'à confirmer le résultat du précédent chapitre, à savoir que cette propriété préventive ne peut nullement servir à mesurer l'immunité.

IV

PROPRIÉTÉ PRÉVENTIVE DU SANG DES PERSONNES MORTES DU CHOLÉRA

Ce sujet a été déjà traité dans une étude très intéressante de M. Botkin, à Saint-Pétersbourg¹. Les recherches sur le pou-

2. M. G..., 45 ans, entre le 15 mars à l'hôpital de Lorient avec tous les signes du choléra algide. Crampes, vomissements, anurie, selles riziformes. Mort le 17 mars.

1. Sur la pathologie du choléra, dans la *Gazette clinique* de Botkin, novembre 1892 (en russe).

voir préventif du sang retiré après la mort des cholériques lui ont montré que cette propriété s'établit bientôt après le début de la maladie. Ce n'est que dans deux cas sur douze, où la mort est survenue en 24 heures (à peu près), que le sérum sanguin était toxique pour le cobaye. Dans la grande majorité des cas, par contre, il était préventif contre le bacille virgule, et cela même à partir de 0,5 c. c. Il va sans dire que dans les cas où la mort est survenue tardivement dans l'état typhoïde, le sérum sanguin était toujours préventif pour le cobaye.

M. Botkin déduit de ses expériences que la mort des cholériques n'est que très rarement causée par la toxine du vibron de Koch; dans la grande majorité des cas, l'organisme acquiert une immunité vis-à-vis de ce microbe et ne succombe que par le fait d'autres causes, non déterminées. Ici encore la déduction repose sur ce principe que la propriété préventive du sang est nécessairement liée à l'immunité, ce qui ne peut nullement être accepté.

Nos propres recherches ont été faites sur dix personnes mortes du choléra dans les services de M. le Prof. Netter, à Paris, et de M. le Dr Fevré, à Ville-Evrard. Nous exprimons ici à ces messieurs toute notre gratitude pour leur obligeant concours.

Comme chez des personnes non cholériques ou en cours du choléra, la moitié des morts de cette maladie nous ont fourni un sang préventif. Sur dix cas, cinq ont fourni un sérum sanguin préventif (v. Appendice III). Dans l'exemple du choléra le plus foudroyant que nous ayons pu étudier (celui de la veuve D..., une maniaque de l'asile de Ville-Evrard, morte neuf heures après le début de la maladie¹), 2 c. c. de sérum sanguin n'ont manifesté aucune propriété préventive. Dans un autre cas (M^{me} A.), survenu dans le même asile, cas où la mort est survenue en 28 heures, le sérum sanguin était préventif à partir de 0,5 c. c.

Quelquefois, malgré la durée beaucoup plus longue de la maladie, le sang n'a pas présenté de propriété préventive. M. F..., mort dans le service de M. Netter (qui a trouvé de nombreux bacilles virgules dans les selles) dix jours après le début de la maladie, a fourni après sa mort un sérum sanguin, dont

1. Les selles nous ont donné une culture pure du bacille virgule.

1,5 c. c. n'ont pas préservé les cobayes contre le vibrion typique de moyenne virulence.

Cette irrégularité dans la propriété préventive du sang, que nous avons notée chez les malades cholériques, s'est donc retrouvée à l'examen du sang retiré après la mort.

V

PROPRIÉTÉ PRÉVENTIVE DES PERSONNES GUÉRIES DU CHOLÉRA

Le plus grand nombre des travaux qui ont été faits sur la propriété préventive du sang vis-à-vis du bacille virgule, se rapporte précisément à des personnes qui ont subi une attaque de choléra. C'est M. Lazarus ¹ qui le premier a fourni des renseignements sur ce sujet. Dans trois cas de choléra, traités à l'hôpital de Moabit, à Berlin, le sérum retiré quelque temps après la guérison présentait un pouvoir préservateur extraordinaire : un décimilligramme de sérum sanguin suffisait déjà pour empêcher la mort des cobayes, inoculés avec le bacille virgule. M. Klemperer ² a trouvé que le pouvoir préventif du sérum de deux personnes guéries du choléra, auxquelles il a retiré du sang, était beaucoup plus faible que dans les cas de M. Lazarus. Le sérum de l'une était préventif à la dose de 0^{gr},01, celui de l'autre à la dose de 0,5 c. c. M. Klemperer explique cette différence par la circonstance que ses malades avaient eu un choléra beaucoup plus bénin que ceux de M. Lazarus.

Tout récemment M. Wassermann ³ a publié les résultats de ses recherches sur la propriété préventive du sang dans un cas de guérison. Il s'agit d'un choléra peu grave survenu à Berlin en octobre 1892 ⁴. Deux jours après la guérison, le sang était si peu préventif que même une dose de 10 c. c. de sérum n'a pu sauver un cobaye inoculé avec le bacille virgule. Un mois plus tard, le sang a acquis la propriété préventive au même degré que dans les expériences de M. Lazarus. Une troisième saignée, pratiquée 54 jours après l'entrée en convalescence, a fourni un

1. *Berlin. klin. Woch.*, 1892, p. 1072.

2. *Ibid.*, 4267.

3. *Zeitschr. f. Hyg.*, 1893, t. XIV, p. 42.

4. *Deutsche med. Woch.*, 1892, p. 927 (Kossel et Beck).

sérum préventif à la dose de un centimilligramme. Cet exemple prouve d'un côté que la guérison peut se faire tout à fait indépendamment de la propriété préventive vis-à-vis du bacille virgule, et de l'autre qu'un choléra bénin n'empêche nullement le sang d'acquérir cette propriété à un très haut degré.

Les six cas étudiés par les auteurs cités démontrent déjà une grande variabilité dans ce pouvoir préventif du sang chez les personnes guéries du choléra. Mes propres expériences confirment cette conclusion de la façon la plus claire. Elles s'étendent sur 24 cas, que je dois surtout à l'obligeance de MM. les docteurs Lesage, Gaillard, Babinsky, Netter et Fevré. Ce sont notamment les 12 cas de M. Lesage et 1 cas de M. Netter qui présentent le plus grand intérêt, car ils sont appuyés sur des recherches bactériologiques.

Parmi les personnes qui ont manifesté le plus fort pouvoir préventif, il faut citer M. H..., qui a subi une attaque de choléra du 9 au 16 septembre 1892 à l'hôpital Saint-Antoine. Le choléra était de force moyenne, mais les déjections contenaient une quantité énorme de bacilles virgules. Le sang retiré 72 jours après le début de la maladie a fourni un sérum préservatif à la dose de un milligramme. Mais, à côté de ce cas et d'autres, où le sang s'est montré moins actif, il faut citer des exemples inverses où le sang n'a pas eu de propriété préventive ou ne l'a manifestée qu'en faible proportion. Une vieille femme, M^{me} P... (71 ans), qui a subi une forte attaque de choléra du 31 août au 6 septembre 1892, et qui a dû être transfusée, a fourni un sérum (sang retiré 81 jours après le début de la maladie), dont 0,25; 0,5; 1; 1,5, et même 2 c. c. ont été incapables de protéger les cobayes contre la dose mortelle minima des bacilles virgules. Et cependant les déjections de cette personne renfermaient de nombreux vibrions de Koch. Chez une autre femme dont le sang m'a été fourni par M. Lesage, la propriété préventive du sérum ne s'est manifestée qu'à partir de 1,5 c. c. La saignée a été pratiquée soixante-quatre jours après le début du choléra, et, malgré sa gravité moyenne, les selles étaient d'une richesse extraordinaire en bacilles virgules. Chez une troisième personne, qui ne rendait avec ses déjections que peu de virgules, 0,75 de sérum sanguin n'ont pas préservé un cobaye, tandis qu'un autre, traité avec 2 c. c. de lait

de la même femme, a résisté à une dose moyenne du vibron de Koch.

Je citerai encore le malade de M. Netter, qui a déjà été mentionné dans le chapitre III comme n'ayant pas la propriété préventive dans le cours de son choléra. Saigné une seconde fois plus de trois semaines après le début de la maladie, il a fourni un sang, incapable de protéger des cobayes même à la dose de 1,5 c. c. Si on se souvient que des quantités bien moindres (1 c. c. et même 0,75) du sérum de personnes qui n'ont jamais eu le choléra suffisent souvent à prévenir la mort des cobayes, on sera étonné de voir le sang de certains individus guéris dépourvu de la propriété préventive à des doses de 1,5 et 2 c. c.

Certaines personnes qui ont eu le choléra fournissent un sérum dont la propriété préventive est si élevée qu'il était naturel de croire que cette propriété existe chez tous les cholériques guéris. Or, sur 24 cas de choléra, nous l'avons trouvée seulement 14 fois, c'est-à-dire dans 58 0/0 des cas. Par contre, nous l'avons constatée à peu près dans la même proportion, 50 0/0, soit chez des personnes qui n'ont pas eu le choléra, soit chez des personnes qui ont succombé à cette maladie.

IV

RÉSUMÉ

Lorsque j'ai entrepris ce travail sur la propriété préventive du sang des cholériques, j'avais l'espérance que cette recherche pourrait éclairer le rôle du bacille virgule dans le choléra, rôle qui est encore si loin d'être élucidé.

Après les premiers résultats positifs, obtenus sur cette propriété préventive, M. Klemperer en a tiré la conclusion qu'ils « fournissaient une preuve irréfutable du rapport étiologique et spécifique du bacille virgule de Koch avec le choléra asiatique » (*B. kl. Woch.*, 1892, n° 50). Même en se plaçant à ce point de vue, à savoir, que l'établissement dans le cours d'une maladie d'un pouvoir préventif du sang vis-à-vis d'un microbe donné, prouve l'action spécifique de ce dernier, on doit reconnaître que les faits communiqués plus haut atténuent notablement la déduction de M. Klemperer. Mais il n'est nullement prouvé que

les bactéries qui occasionnent la maladie soient seules capables de produire la propriété préventive du sang. Il est très probable que les microbes qui végètent paisiblement dans l'organisme possèdent également cette fonction. Aussi pourrait-on expliquer la propriété préventive du sang des personnes non atteintes du choléra par l'action des vibrions si nombreux dans les organes digestifs de l'homme sain.

D'un autre côté, les recherches multiples sur la propriété préventive du sang ont démontré de plus en plus que le rapport étroit que l'on croyait exister entre cette propriété et l'immunité n'existe pas en réalité. Les faits, sommairement rapportés dans ce mémoire, fournissent une nouvelle preuve de ce que le sang peut être préventif sans que l'organisme soit réfractaire.

La recherche que j'ai entreprise ne peut donc pas résoudre le problème que je me suis posé. Elle démontre que le but ne peut être atteint que par d'autres voies. Et cependant je n'ai pas hésité à publier les faits que j'ai pu réunir, car, dès que le problème du bacille virgule sera définitivement résolu, ils pourront facilement être utilisés. Même actuellement, dans l'état d'indécision où nous sommes, ils peuvent nous fournir des indications précieuses.

Ainsi, dans la question des vaccinations préventives, il est très important d'avoir un point d'appui pour reconnaître la méthode qui est la meilleure. M. Klemperer, dont les idées ont été souvent exposées dans ce mémoire, croit indispensable d'atteindre, à l'aide d'injections vaccinales, le plus haut degré de propriété préventive du sang qui ait été observé chez l'homme guéri du choléra. Tous les moyens qu'il a employés étant impuissants à produire ce résultat, M. Klemperer voit de très grandes difficultés sur son chemin. Les faits que j'ai exposés doivent le rassurer. Il n'est point nécessaire, même pour guérir d'un choléra grave, de réaliser la propriété préventive du sang vis-à-vis du bacille virgule. Dans les essais qui pourront être entrepris sur la vaccination de l'homme, il ne faut donc nullement tenir compte de cette fonction, et il ne faut pas s'arrêter devant l'emploi de virus, malgré le peu de pouvoir préventif qu'ils confèrent.

De nos recherches sur la propriété préventive du sang chez 68 personnes, il résulte que ce pouvoir — vis-à-vis du vibron typique

d'origine indienne — est extrêmement variable. Il existe presque chez la moitié des hommes qui n'ont pas eu le choléra, et dans 58 0/0 des personnes qui en ont subi l'attaque. Presque la moitié des malades cholériques et la moitié des individus morts de cette affection présentent également la propriété préventive du sang.

La guérison peut se faire sans que cette propriété s'établisse.

APPENDICE I

ACTION DU SANG DES PERSONNES QUI N'ONT PAS EU LE CHOLÉRA

N.	Quantité de sérum employé en c. c.	Prévention existante ou non.
1. Dr C. (bien portant)	0,75	+
2. Dr W. (bien portant)	1,25	+
3. Dr A. (bien portant)	1,0	—
4. Soldat (pneumonie)	2,0	—
5. Id. (urémie)	1,0	+
6. Id. (bronchopneumonie)	1,0	+
7. Id.	2,0	—
8. Id.	2,0	—
9. Id.	2,0	—
10. Id.	1,5	+
11. Id. (hémiplegie)	2,5	—
12. Nouveau-né.	1,0	—

APPENDICE II

ACTION DU SANG DES PERSONNES ATTEINTES DE CHOLÉRA

N.	Moment de la saignée après le début.	Quantité de sang.	Pro- priété préventive.	Issue de la maladie.	Résultat de l'examen bactériologique.
1. M. D. (lypémanie aiguë)	3 jours	2 gouttes	+	guérison	Bac. virg.
2. Enfant L. —	48 heures	2 gouttes	—	guérison	Bac. virg.
3. Mme V. —	8 jour ^s	qq. gouttes 1. c. c. de lait	—	guérison	
4. Mme C. —	4 jours	qq. gouttes	—	mort	
5. M. L. N. —	22 heures	3 gouttes	—	mort	Bac. virg.
6. Mlle M. C. —	2 jours	1 goutte	—	guérison	Bac. virg.
7. Mlle L. G. (diarrhée)	5 jours	2 gouttes	—	guérison	B. coli seul.
8. Mme B. (dégénér. ment.)	6 jours	0,2 c. c.	—	mort	
9. Mme B. de Lorient, —	5 heures	3 gouttes	+	mort	Beaucoup B. v.
10. M. L. B. —	5 jours	2 gouttes	—		Nombreux B. v.
11. M. Mul. —	5 jours	1,5 c. c. } 1 c. c. } sérum	—	guérison	B. v. (Dr Netter).
12. M. M. —	4 jours	0,5 } 1,0 } sérum	—	guérison	B. v. (Dr Netter).
13. Mme K. —	48 heures	q. q. gouttes	—	mort.	
14. M. B. (manie aiguë)	3 jours	0,25 sérum	—	guérison	
15. N. de Bruxelles, —	—	0,75 sérum	—		
16. N. de Lorient, —	2 heures	qq. gouttes	—		
17. M. Ph. désinfecteur, Lorient,	lendemain	1,5 c. c. sérum	+	guérison	Bac. virg.
18. M. G. —	—	qq. gouttes	+	mort en 72 h.	Bac. virg.
19. M. L. —	—	qq. gouttes	—	mort	
20. Mlle L. —	—	qq. gouttes	—	guérison	
21. M. H. —	—	qq. gouttes	—	guérison	
22. M. A. —	6 jours	qq. gouttes	+	mort.	Point de B. v.

APPENDICE III

ACTION DU SÉRUM SANGUIN DES PERSONNES MORTES DU CHOLÉRA

N ^o d'ordre.	Durée de la maladie.	Quantité du sérum en c. c.	Résultat.	Bacilles virgules.
1. Mlle P.		0,75	+	Constatés par M. Netter.
2. M. T.	10 jours	1,5	—	Nombreux (par Netter).
3. Vve B. (maniaque)	48 heures	2,0	—	Masse.
4. Vve D. (maniaque)	9 heures	2,0	—	Masse.
5. Mme A. (lypémanie)	16 heures	0,5	+	
6. M. L. —	34 heures	1,5	—	Constatés par M. Netter.
7. Mme D. —	8 jours	0,5	+	
8. Mme R. —	33 heures	0,5	+	
9. Vve M. —	48 heures	1,00	—	Constatés par M. Netter.
10. Mme T. —	10 jours	0,25	+	Beaucoup (M. Netter.)

Comme avec le sérum de chaque cas il a été fait plusieurs expériences, je ne donne que la dose maximale dans les cas négatifs et la dose minimale dans les cas positifs.

APPENDICE IV

N ^o d'ordre.	Moment de la saignée après le début de la maladie.	Quantité de sang ou de sérum en c. c.	Résultat.	Bacilles virgules.
1. M. D.	19 jours	1,0	+	
2. M. L.	20 jours	0,5	+	
3. M. C.	17 jours	1,0	+	
4. Mme X.	9 jours	0,33	—	
5. Mme T.		0,5	+	
6. M. G.	16 jours	1,0	—	
7. M. V.	14 jours	0,75	—	
8. Mlle K.	65 jours	0,2	+	Nombreux (Dr Lesage).
9. Mme R.	67 jours	0,125	—	Nombreux (Dr Lesage).
10. Mme M.	56 jours	1,5	+	Masse (Dr Lesage).
11. M. C.	56 jours	1,5	+	Pas de bac. virg. (Dr Lesage).
12. M. H.	73 jours	0,001	+	Masse (Dr Lesage).
13. M. M.	84 jours	1,5	+	Peu (Dr Lesage).
14. Mme P.	83 jours	2,0	—	Nombreux (Dr Lesage).
15. Mme L.	80 jours	0,25	—	Abondants (Dr Lesage).
16. Vve M.	9 jours	qq. gouttes de sang.	+	
17. Mme S.	75 jours	0,75 sérum (2 c. c. de lait)	—	Peu (Dr Lesage).
18. Mme G.	89 jours	0,5 sérum	+	Notable quantité (Dr Lesage).
19. M. A.	88 jours	qq. gouttes de sérum	—	Nombreux (Dr Lesage).
20. Vve P. (diarrhée)	33 jours	0,5	+	
21. Vve Per. (maniaque)	39 jours	0,25	+	
22. Vve Lar. (mélancolie)	27 jours	0,5	—	
23. Vve Lo (chol. léger)	62 jours	1,0	+	
24. M. M.	22 jours	1,5	—	Quantité moyenne (Prof. Netter).

REVUES ET ANALYSES

SUR LES SUCRES A CINQ ATOMES DE CARBONE OU PENTOSE

REVUE CRITIQUE

La marche du progrès est curieuse à suivre depuis quelques années dans les applications de la microbiologie à la médecine. C'est d'un laboratoire de chimie qu'est partie la première impulsion, et les médecins ont en général estimé cette origine un peu suspecte, jusqu'au jour où ils ont vu entrer en scène des questions qu'ils jugeaient avec raison être de leur domaine, celles qui ont trait à la réaction de l'être vivant contre les ennemis qui viennent l'assaillir. « Il n'y a pas que des microbes, disaient-ils, il y a un être vivant qui se défend, et qui utilise pour cela les propriétés et les réactions de ses tissus, que nous avons la prétention de connaître mieux que personne. » De leur côté, ceux qu'avec une charmante insistance ils appelaient alors des *chimistes* croyaient, à ce moment, pouvoir réduire beaucoup l'importance de ces réactions vitales. Le charbon, qui était alors et est encore la maladie infectieuse la mieux connue, ne se montrait-il pas particulièrement insouciant des questions de race et de résistance individuelle ? Il y avait bien l'histoire des moutons d'Algérie qui ne prennent pas le charbon comme les moutons de France, celle de la poule refroidie qui devient charbonneuse quand la poule ordinaire reste indemne. On avait bien aussi constaté des différences individuelles dans une même espèce animale, mais ces variations étaient largement dépassées par celles qui provenaient des changements de virulence de la bactériémie, et en somme c'était cette bactériémie qui apparaissait comme la pièce maîtresse, sinon comme la pièce unique du mécanisme.

C'est peu à peu que l'attention s'est portée sur les rouages du mécanisme résistant : pendant quelque temps on a pu croire que cette réaction était d'essence purement vitale, et ne pouvait pas quitter le

terrain de la médecine proprement dite. Mais voilà que, par un nouveau détour, le problème repasse sur le terrain de la chimie, et ce serait faire offense à nos lecteurs que de leur rappeler la tournure, presque exclusivement chimique, qu'ont prise depuis quelques années les questions de phagocytose, de vaccination, d'immunité. Si bien qu'en ce moment, après avoir reproché aux chimistes de faire de la médecine, voilà que les médecins commencent à faire de la chimie.

Le tout est de la faire bonne. De quoi se compose donc cette cellule vivante qui, lorsqu'elle intervient dans la lutte, ne le fait que par ses diastases, ses excrétions, ses sécrétions, par les modifications d'ordre chimique dont elle devient elle-même le siège aussi bien que par celles qu'elle produit dans le milieu ambiant? Quels sont ceux de ses éléments chimiques qui jouent un rôle physiologique? A cette question, les chimistes sont forcés de se gratter un peu l'oreille. La seule chose qu'ils sachent bien au sujet de la cellule, c'est qu'ils ne savent pas grand'chose.

Ils en ont assez bien dépecé les membres principaux, et y ont reconnu des matières albuminoïdes, des corps gras, des sucres, des celluloses, des gommes, des acides divers, des bases alcaloïdiques ou autres. Ils savent même en isoler à l'état pur, et y doser certaines substances, séparer les corps gras des sucres et des matières azotées; mais, quand il s'agit de pénétrer dans le détail, de savoir ce que sont ces corps gras, ces sucres, ces matières albuminoïdes, ils sont fort embarrassés, et quand ils sont prudents, ils gardent le silence. Il est vrai qu'il y en a qui préfèrent parler beaucoup quand ils ne savent rien.

Quand on a par exemple dosé et étudié les cendres dans un tissu animal ou végétal, qu'on en a dissous les corps gras au moyen de l'éther, qu'on en a précipité les matières albuminoïdes par un ou plusieurs des nombreux réactifs proposés pour cet usage, quand on en a séparé la partie insoluble dans les acides et les alcalis étendus, et qui est comptée comme cellulose, il reste un résidu, souvent décoré du joli nom d'extractif, dans lequel, si l'opération a été bien faite, n'existe plus aucun des éléments précédents, mais qui n'en est pas moins encore une vraie bouteille à l'encre. En physique, a-t-on dit, il y a de grandes découvertes à faire en ce moment aux environs de la quatrième décimale. La chimie, la microbiologie et la médecine réservent de même leurs plus belles couronnes à qui leur fera connaître ce que c'est que l'extractif, et on peut promettre la gloire au triomphateur heureux d'un bâton de réglisse.

Les travaux de Fischer, que nous avons résumés récemment¹, sont un premier pas dans cette voie, et leur importance physiologique n'aura

1. Ces *Annales*, t. VI, p. 785.

pas moins frappé le lecteur que leur valeur scientifique. N'est-il pas curieux, par exemple, que soient seuls capables de fermenter facilement, c'est-à-dire de servir aux besoins nutritifs anaérobies des cellules de levure, les sucres renfermant trois, six ou neuf atomes de carbone. Un procès vital qui enlève ou ajoute à un sucre fermentescible un ou deux atomes de carbone le transforme en produit de réserve, inattaquable par la cellule qui l'a produit, jusqu'au jour où un nouveau procès vital, ajoutant ou enlevant un nouvel atome, fait de cette réserve nutritive une nouvelle matière alimentaire.

La conclusion toute naturelle de ces déductions est que les sucres dont le nombre des atomes de carbone n'est pas un multiple de 3, s'ils existent, doivent se trouver dans cet extractif qui est en quelque sorte le *caput mortuum* des méthodes analytiques jusqu'ici en usage, et qu'on a chance de les y rencontrer, à la condition de les y chercher par des méthodes analytiques nouvelles capables de les faire découvrir.

C'est l'exactitude de cette déduction que je voudrais montrer pour les sucres à cinq atomes de carbone, les *pentoses*, et je n'aurai pour cela qu'à résumer les intéressantes études de B. Tollens et de ses collaborateurs Stone, Wheeler, Allen, Gunther et de Chalmot.

On connaissait jusqu'ici deux seulement des huit pentoses que la théorie de Fischer indique comme possibles, l'arabinose, découverte par Scheibler dans la gomme arabique, le xylose, découvert par Koch dans la sciure de bois, surtout de bois de hêtre, et caractérisé comme pentose par Tollens, Wheeler et Allen.

Ces pentoses $C^5 H^{10} O^5$ présentent un certain nombre de réactions caractéristiques. En premier lieu, quand on les chauffe avec de l'acide chlorhydrique d'une concentration déterminée, ils fournissent non de l'acide lévulinique, mais du furfurol $C^5 H^4 O^2$ en perdant pour cela trois atomes de $H^2 O$. Ce furfurol est volatil et passe à la distillation. On peut le doser dans le liquide distillé en le combinant avec la phénylhydrazine en présence de l'acide acétique. Il se forme une hydrazone presque insoluble qu'on peut peser, ou encore estimer par un titrage volumétrique, en déterminant ce qu'il faut d'une solution de phénylhydrazine d'une concentration déterminée pour précipiter tout le furfurol présent dans la liqueur.

Aucune de ces méthodes n'est, il est vrai, absolument précise, mais elles n'en sont pas moins précieuses. Quand on veut se borner à déceler la présence du pentose, sans se donner la peine de le doser, on peut se contenter de chauffer pendant quelque temps, au bain-marie, avec de l'acide chlorhydrique étendu, la matière à étudier : on filtre, on ajoute au liquide filtré de l'acide chlorhydrique concentré et un peu de phloroglucine : il se développe une belle couleur rouge cerise

dans le liquide, pour peu qu'il y ait de l'arabinose ou du xylose présent. Ce rouge est encore mieux caractérisé par la belle bande d'absorption qu'il fournit quand on l'examine au spectroscope.

En opérant par ces méthodes, on trouve que les pentoses sont extrêmement répandus dans le monde végétal, et même qu'ils constituent quelquefois une part importante de l'extractif non azoté, ainsi que le montrent les nombres suivants qui donnent, pour chacune des plantes analysées, la proportion centésimale d'extractif non azoté et la proportion centésimale des pentoses.

	Extrait non azoté.	Pentose.
Paille de seigle.....	33 o/o	25 o/o
Paille de froment.....	37	26
Paille d'orge.....	37	26
Paille d'avoine.....	36	26
Fanes de pois.....	34	17
Foin de prairie.....	35-38	9
Bois de hêtre.....	»	24-20
Bois de sapin.....	»	8-13
Drèche de bière.....	44	22
Son de froment.....	55-88	25
Tranches de betteraves.....	55	33

On voit que, dans les pailles alimentaires, les pentoses font plus du quart du poids de la paille, et constituent plus de moitié de l'extractif non azoté. Il y en a aussi beaucoup dans les cossettes de betterave et dans le son de froment. Nous rejetons ces matières de notre alimentation : les animaux de la ferme s'en nourrissent. Est-il défendu de penser que les pentoses sont inassimilables pour nous, assimilables pour eux, et qu'ainsi le nombre d'atomes de carbone d'une molécule de sucre, que nous venons de voir jouer un rôle dans l'alimentation de la levure, en joue un aussi dans l'alimentation des animaux supérieurs.

De même ne peut-on pas se demander si le pentose qu'on trouve si abondamment dans ces plantes alimentaires ne serait pas lui-même leur sucre alimentaire, et si ce n'est pas pour se faire des réserves inassimilables pour elles qu'elles transforment ce pentose en sucre ou en amidon assimilables pour nous. On pressent sous cette enveloppe d'hypothèses un mécanisme à la fois simple et délicat qu'il faut s'efforcer maintenant de mettre au jour. Ce sont des questions de structure atomique qui dominent le monde.

Arrivés à ces notions, nous serions impardonnables de ne pas jeter un coup d'œil sur les matières albuminoïdes. Ne se passe-t-il pas là aussi des phénomènes de même nature? Pourquoi l'animal en lactation secrète-t-il de la caséine pendant une certaine période, pas avant et pas après? Quel est le ressort qui déclanche le mécanisme de la sécrétion du lait et qui l'arrête ensuite à nouveau? Est-ce qu'à l'état

normal il y a sécrétion d'une diastase qui permet à la caséine constamment produite d'entrer dans le cycle d'alimentation et de s'y détruire, et qui, disparaissant après la gestation, ferait passer la caséine à l'état de réserve inassimilable? Y a-t-il là au contraire des actions analogues à celles que nous venons de constater chez les sucres, et des pentoses et des hexoses parmi les matières albuminoïdes?

C'est une question que nous ne sommes pas prêts à aborder dans toute son étendue, mais sur laquelle nous trouvons précisément un renseignement intéressant dans les travaux de M. Tollens et de ses collaborateurs. De leurs recherches il résulte qu'en faisant bouillir de la fibrine ou de l'albumine avec de l'acide chlorhydrique, il ne se produit pas d'acide lévulinique. Cela témoigne qu'il n'entre dans la constitution de ces substances aucun sucre à six atomes, tels que galactose, dextrose, glucose. Mais la caséine et la viande de cheval soigneusement débarrassée de toute trace de sucre ordinaire, donnent au traitement à chaud par l'acide chlorhydrique de petites quantités de furfurol; les autres matières albuminoïdes en fournissent aussi, mais beaucoup moins.

Je ne suis pas prêt à en conclure, comme ces savants, qu'il y a quelque part une molécule de pentose dans la molécule très compliquée de la matière albuminoïde. Ces matières ne se débarrassent que très difficilement des matériaux qui les accompagnent dans l'organisme, et on n'est jamais sûr, quelques soins qu'on ait pris, de les avoir complètement purifiées. Il faut donc se méfier des mélanges, et se garder de les prendre pour des combinaisons. En particulier, la caséine de la vache qui a mangé du foin, la viande de cheval qui a été nourri de paille contiendraient un peu de pentose qu'il ne faudrait pas en être surpris. Mais ce qui est remarquable et nous ramène à nos idées sur l'influence du nombre d'atomes de carbone sur la qualité alimentaire d'une substance, c'est que l'acide glycuronique donne, comme l'arabinose et le xylose, de grandes quantités, jusqu'à 46 0/0 de furfurol. Or, cet acide glycuronique apparaît dans l'urine de l'homme et du chien, dans certains modes d'alimentation. On le considérerait jusqu'ici comme un des premiers degrés d'oxydation du sucre. Il semble, d'après ce qui précède, qu'il ait une constitution plus compliquée, et représente un mode d'élimination urinaire des pentoses.

On voit en résumé combien est riche de promesses ce bourgeon nouveau de l'arbre de la science, et pourquoi nous l'avons signalé à nos lecteurs dès son apparition. Les microbiologistes ni les médecins n'ont plus le droit de rester indifférents à ces découvertes sur la chimie de la cellule, et c'est pour eux que travaillent constamment ces chimistes autrefois si dédaignés.

Dx.

FRITZ BAUMANN. — Contribution à l'étude de la maturation du fromage.
Diss. inaug. Königsberg, 1893.

Je signale ce travail, parce qu'il tranche par ses allures sur la majorité des études consacrées depuis quelques années aux bactéries du lait et du fromage, et qui étaient construites sur le même type. La méthode des cultures sur milieux solides avait séduit tout le monde; rien ne valait en dehors d'elle, et il n'y avait aucun compte à tenir de ce qui avait été écrit avant qu'elle fût inventée. On trouverait encore, sans trop chercher, des savants porteurs de cette espèce de lunettes. Mais on commence un peu partout à reconnaître que, si la méthode des cultures sur gélatine est incomparable pour séparer et purifier les mélanges d'espèces, il avait été fait des cultures pures avant qu'elle existât, et que les milieux liquides, moins facilement maniables comme moyens de séparation, présentent l'avantage incontestable de donner sur la biologie des bactéries, sur les transformations qu'elles produisent dans les substances dont elles se nourrissent, sur les produits qu'on peut en retirer, des renseignements précieux. La méthode des gélatines nous renseigne surtout sur la morphologie, celle des bouillons sur la physiologie : or, comme moyen diagnostique, la physiologie dépasse de beaucoup la morphologie, parce qu'elle est beaucoup plus variée. Aussi voit-on de plus en plus l'étude chimique des liquides de culture se substituer, dans les cas difficiles, à la description même minutieuse des formes microscopiques et des colonies sur gélatine, gélose ou pomme de terre.

C'était la voie que j'avais choisie dans mes études sur les microbes du lait. Outre qu'elles ont été commencées à une époque où on ne connaissait pas les cultures sur milieux solides, la question de forme m'a toujours paru secondaire, la question de fonction importante au contraire, et j'attache beaucoup plus de prix à avoir démontré nettement, chez certains microbes, cette double sécrétion de diastases qui leur permet de coaguler la caséine avec leur présure, de la redissoudre au moyen de leur caséase, qu'à avoir décrit huit ou dix espèces de *Tyrophrix*.

M. Baumann n'est pas mon élève, il ne semble même pas avoir connu toutes mes publications sur ce sujet, mais il marche dans les mêmes voies, et va même plus loin, car, ayant à étudier une bactérie qu'il juge jouer un rôle dans la maturation de l'Emmenthaler, il ne se contente pas de l'ensemencer sur la gélatine et de décrire minutieusement la forme et l'aspect des colonies : il se propose, ce qui est infiniment plus difficile, plus méritoire, et plus intéressant, de l'ensemencer dans du lait, de fabriquer ensuite du fromage avec ce lait, et de voir

comment se comporte ce fromage sous l'influence de la bactérie qu'on y a introduite.

Ce petit programme a l'air anodin : il n'en est pourtant pas de réalisation plus difficile. Pour avoir une culture pure, ou à peu près pure, de la bactérie ensemencée dans le fromage, il faut d'abord stériliser le lait. Or, pour stériliser le lait, il n'y a que le chauffage, et le lait chauffé ne se laisse pas coaguler comme le lait ordinaire. Le caillé qu'il fournit sous l'action de la présure est floconneux et ne se laisse pas agglomérer en fromage.

Première difficulté, dont M. Baumann triomphe en montrant qu'après deux heures à 70°, le lait donne encore avec la présure un coagulum convenable et est à peu près stérilisé. Les microbes qui y persistent sont trop peu nombreux pour gêner le développement du bacille qu'on y introduira, pour peu que l'ensemencement soit copieux.

Ce n'est pas tout : il faut aussi se méfier des bactéries qui proviennent de la présure. Celle-ci, toujours riche en microbes, doit être stérilisée et, si on la chauffe, on détruit son principe actif. Dans mes premières expériences sur ce sujet, j'avais stérilisé ma présure par une filtration poreuse. M. Baumann y arrive tout aussi simplement en constatant qu'après trois ou quatre chauffages à 58°3, durant chacun quatre heures trente minutes, et espacés par des intervalles de vingt-quatre heures, une présure s'était débarrassée de tous ses germes sans avoir beaucoup perdu de sa force. Voici une de ses expériences :

N. de germes dans 1 c. c. de présure initiale.....	4,407,600
— après la 1 ^{re} stérilisation.....	10,630
— vingt-quatre heures après (2 ^e stérilisation)....	31,870
— après la seconde stérilisation.....	0
— vingt-quatre heures après la seconde stérilisation	40
— après les 3 ^e , 4 ^e , 5 ^e stérilisations.....	0
Force initiale de la présure.....	100
Force après la 6 ^e stérilisation.....	56,5

La présure pouvait donc encore servir à la fabrication du fromage, à la condition d'en doubler la dose, et en ensemençant dans ce fromage la bactérie qu'il voulait étudier, M. Baumann a pu faire une culture en grand, et dans les conditions de la pratique.

Je peux être bref au sujet de cette bactérie, car il me paraît qu'elle est identique à celle que j'ai décrite en 1882, dans mon premier mémoire sur le lait, sous le nom d'*Actinobacter polymorphus* ; je ne relève qu'une différence avec celle que M. Baumann appelle *Bacillus diatrypticus casei* ; c'est que son bacille ne lui a pas fourni d'acide acétique comme fait le mien, mais au contraire de l'acide lactique.

Mais, avec ce microbe, l'acide lactique comme l'acide acétique sont des produits intermédiaires, tantôt présents, tantôt absents suivant les conditions de la culture, et dont la présence ou l'absence n'ont rien de particulièrement significatif.

En revanche, les deux microbes se ressemblent par leurs dimensions et leur forme; ils produisent de l'alcool aux dépens du sucre de lait, et je me suis assuré depuis que le mien existait souvent dans la fermentation panaire, où il donnait aussi de l'alcool. Les deux bacilles ont une auréole très large et très nette, et se comportent de même dans les différents milieux. En particulier, ils peuvent mener une vie anaérobie, et dégager un mélange d'acide carbonique et d'hydrogène.

Le rôle de ce microbe dans la production des *yeux* dans la pâte de l'Emmenthaler n'est pas douteux, et même M. Baumann explique la supériorité reconnue des fromages de la vallée d'Emmen non à la supériorité des pâturages, ni à la richesse du lait en matière grasse, mais à ce que le mélange bactérien qui s'y ensemence spontanément est plus homogène et mieux *adapté* aux pratiques de fabrication que partout ailleurs. C'est là une conclusion curieuse, analogue à celle qui bat en ce moment les buissons de la science au sujet des vins. Si elle se confirme, il faudra dresser quelque part une statue à la bactérie de l'Emmenthal et à la cellule de levure de Champagne. Ce seront des gloires provinciales.

Dx.

E.-J. KOTLIAR. — L'influence de la lumière sur les bactéries.
Vratch, n° 39, p. 975, 1892.

L'auteur a fait agir sur le *bacillus pseudanthracis*, la *sarcina aurantiaca* et le *micrococcus prodigiosus*, la lumière solaire qui traversait préalablement un certain nombre de couches de gélatine colorée.

La lumière ainsi obtenue s'est montrée à peu près monochromatique au spectroscope. Les cultures ont été faites dans de la gélose ou sur pomme de terre.

Les microbes ont très bien poussé dans les tubes éclairés par la lumière rouge. Leur développement a été à peu près équivalent à celui des microbes protégés contre toute lumière, et meilleur que celui des microbes exposés à la lumière diffuse. Par contre, dans les tubes éclairés par la lumière violette, le développement a été plus lent qu'à la lumière diffuse; il était plus lent encore dans les tubes exposés à la lumière solaire entière.

L'auteur s'est assuré, par des expériences directes, que cette action est indépendante de l'élévation de la température qui se produit à la

suite d'une exposition prolongée à la lumière solaire. Les résultats de M. K. confirment, sur ce point, ceux obtenus autrefois par M. Duclaux.

Dans une autre série d'expériences, l'auteur est arrivé à voir que la lumière violette exerce une influence favorable sur la formation de spores chez le *bacillus pseudanthracis*, tandis que la lumière rouge est défavorable et que la lumière blanche tient le milieu entre les deux.

MEY.

INSTITUT PASTEUR

Personne morte de rage après traitement.

MICOIN AUGUSTIN, 48 ans, de Versailles; mordu le 15 mars 1892, traité à l'Institut Pasteur du 17 mars au 31 mars.

Les morsures, au nombre de deux, situées dans le premier intervalle intermétacarpien de la main droite et sur le cinquième doigt de la main gauche, avaient été pénétrantes et n'avaient pas été cautérisées.

L'animal mordeur, un chat errant, avait été abattu et soumis à l'examen de M. Fouillet, médecin vétérinaire à Versailles, qui avait conseillé l'envoi immédiat à l'Institut Pasteur de la personne mordue.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés le 10 avril; entré à l'hôpital de Versailles, Micoïn y est mort le 11. Deux cobayes ont été inoculés avec une portion de son bulbe, le 14 avril; ils ont été pris de rage le 27 avril.

Personne prise de rage pendant le traitement.

FERUDJA FRANÇOIS, 12 ans, de Guelma, Algérie; mordu le 5 avril 1892, traité à l'Institut Pasteur à partir du 12 avril.

Les morsures très profondes étaient au nombre de deux; elles siégeaient l'une au niveau de l'arcade sourcilière gauche, l'autre sur la face interne de l'avant-bras gauche. Elles avaient été lavées à l'eau phéniquée deux heures après l'accident.

L'animal mordeur, un chien kabyle, avait été reconnu enragé après examen vétérinaire.

Le 23 avril, avant que le traitement ne fût terminé, les premiers symptômes rabiques se sont manifestés par de vives douleurs localisées vers l'arcade sourcilière gauche au point de la morsure. Transporté à l'Hôpital des Enfants-Malades, le jeune Ferudja y est mort le 26 avril.

INSTITUT PASTEUR.

STATISTIQUE ¹ DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE — AVRIL 1893.

	A		B		C	
Morsures à la tête { simples	2	»	2	4	»	1
et à la figure { multiples	»	»	2	»	1	1
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»
— inefficaces	»	»	1	»	»	»
Pas de cautérisation	»	»	3	»	1	»
Morsures aux mains { simples	4	5	29	62	11	23
— multiples	1	»	33	»	12	»
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	5	»
— inefficaces	2	»	12	»	6	»
Pas de cautérisation	3	»	50	»	17	»
Morsures aux mem- { simples	»	»	19	34	12	28
bres et au tronc { multiples	1	1	15	»	16	»
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»
— inefficaces	»	»	7	»	9	»
Pas de cautérisation	1	»	27	»	19	»
Habits déchirés	1	»	26	»	22	»
Morsures à nu	»	»	8	»	6	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	»	3	3	1	1
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»
— inefficaces	»	»	1	»	1	»
Pas de cautérisation	»	»	2	»	»	»
Habits déchirés	»	»	»	»	»	»
Morsures à nu	»	»	3	»	1	»
<hr/>						
Totaux. { Français et Algériens	6	6	101	103	51	53
{ Etrangers	»	»	2	»	2	»
	A		B		C	
<hr/>						
TOTAL GÉNÉRAL			162			

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 153 fois ; chats, 9 fois

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.